

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
KOMM.: PROF. DR. BERND SALZBERGER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Die Regulation von CD163 in der Adipositas und im Typ II Diabetes mellitus

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Daniela Sporrer

2011



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
KOMM.: PROF. DR. BERND SALZBERGER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Die Regulation von CD163 in der Adipositas und im Typ II Diabetes mellitus

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Daniela Sporrer

2011

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christa Büchler

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Aslanidis Charalampos

Tag der mündlichen Prüfung:

21.04.2011

*Meinen Eltern sowie Markus  
In Liebe und Dankbarkeit gewidmet.*

---

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Metabolische Syndrom und seine Entstehung .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition und Prävalenz des Metabolischen Syndroms .....	1
1.1.2	Adipositas als wichtige Komponente in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen .....	2
1.1.2.1	Definition und Prävalenz von Adipositas .....	2
1.1.2.2	Das Fettgewebe als wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort und der systemischen Inflammation .....	2
1.1.2.3	Die Rolle von Makrophagen in der Adipositas und damit assoziierte Erkrankungen .....	4
<b>1.2</b>	<b>Das menschliche Fettgewebe als endokrines Organ.....</b>	<b>5</b>
1.2.1	Das Adipokin Adiponektin.....	5
1.2.2	Synthese und Regulation von Adiponektin .....	5
1.2.3	Biochemische Charakterisierung .....	6
1.2.4	Charakterisierung der Adiponektinrezeptoren.....	6
1.2.5	Regulation und funktionelle Bedeutung von Adiponektin .....	7
1.2.5.1	Systemisches Adiponektin und Körpergewicht (BMI).....	7
1.2.5.2	Die Rolle von Adiponektin bei Diabetes mellitus Typ 2 .....	8
1.2.5.3	Die Rolle von Adiponektin bei der Entstehung von Atherosklerose.....	8
1.2.5.4	Beeinflussung der Funktion humaner Monozyten und Makrophagen durch das Adipokin Adiponektin .....	9
<b>1.3</b>	<b>CD163 – ein monozyten- bzw. makrophagenspezifisches Oberflächen- antigen .....</b>	<b>10</b>
1.3.1	Biochemische Struktur des Oberflächenmoleküls CD163 .....	11
1.3.1.1	Die Familie der cysteinreichen Scavengerrezeptoren .....	12
1.3.2	Funktionelle Bedeutung der membrangebundenen Form des CD163 .....	13
1.3.2.1	CD163 als Hämoglobin-Scavengerrezeptor.....	13
1.3.2.2	Die Rolle von CD163 bei der Abwehr bakterieller Infekte .....	15
1.3.2.3	Regulation der CD163-Expression durch pro- und antiinflammatorische Stimuli...16	
1.3.2.3.1	Herabregulation der CD163-Expression .....	16
1.3.2.3.2	Hochregulation der CD163-Expression.....	17

---

1.3.2.3.3	CD163 als Mediator der antiinflammatorischen Immunregulation .....	18
1.3.3	Die lösliche Form des Oberflächenmoleküls CD163 (sCD163) .....	18
1.3.3.1	Generierung der löslichen Form .....	19
1.3.3.2	Bedeutung und Funktion des löslichen CD163 .....	20
<b>1.4</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>22</b>
2.1.1	Geräte .....	22
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.3	Chemikalien .....	24
2.1.4	Antikörper .....	25
2.1.4.1	Primäre Antikörper .....	25
2.1.4.2	Sekundäre Antikörper .....	25
2.1.5	Kit-Systeme .....	26
2.1.6	Puffer und Lösungen .....	26
2.1.6.1	Lösungen für Arbeiten mit Proteinen .....	26
2.1.6.1.1	Lösungen für die Herstellung von Proteinextrakten .....	26
2.1.6.1.2	Lösungen für SDS-PAGE .....	27
2.1.6.1.3	Lösungen für Western-Blot .....	28
2.1.6.1.4	Lösungen für CD163-ELISA .....	28
2.1.6.1.5	Lösungen für IL 6-ELISA .....	29
2.1.6.2	Lösungen für die Isolierung primärer humaner Monozyten .....	30
2.1.6.3	Lösungen für Durchflusszytometrie .....	30
2.1.7	Primer für LightCycler-Analysen .....	30
2.1.8	Rekombinantes Adiponektin .....	31
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>31</b>
2.2.1	Erstellen einer EDTA-Plasma-Bank männlicher Typ 2 Diabetiker und geeigneter Kontrollen .....	31
2.2.2	Isolierung humaner peripherer Monozyten aus Vollblut .....	32
2.2.3	Herstellen von autologem Serum .....	34
2.2.4	Arbeiten mit cDNA/RNA .....	34
2.2.4.1	Isolierung von RNA .....	34
2.2.4.2	Real-Time PCR .....	35
2.2.5	Proteinchemische Methoden .....	37

---

2.2.5.1	Präparation von Gesamtproteinextrakten .....	37
2.2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	38
2.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	38
2.2.5.4	Western-Blot .....	39
2.2.5.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	40
2.2.5.5.1	DuoSet® ELISA Development System human IL 6 .....	40
2.2.5.5.2	CD163 Enzyme Immunoassay .....	41
2.2.6	Durchflusszytometrie .....	42
2.2.7	Stimulierung von primären Monozyten .....	44
2.2.8	Statistik.....	45
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Einfluss von Adiponektin auf das monozytäre CD163.....</b>	<b>46</b>
3.1.1	Einfluss von Adiponektin auf die CD163-mRNA und -Proteinexpression .....	46
3.1.2	Einfluss von Adiponektin auf die lösliche Form von CD163 .....	48
3.1.3	Wirkung von Adiponektin auf die CD163-Expression in Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	49
3.1.4	Suppression von CD163 in Abhängigkeit von der Adiponektinkonzentration .....	51
3.1.5	Einfluss von Adiponektin auf die CD163-Expression differenzierter Makrophagen nach Stimulation mit Interleukin 10 .....	52
<b>3.2</b>	<b>Auffinden von Signalwegen, die möglicherweise an der Adiponektin- vermittelten Reduktion von CD163 beteiligt sind.....</b>	<b>53</b>
3.2.1	Rolle der p38-MAP Kinase in der Reduktion von CD163 durch Adiponektin.....	53
3.2.2	Aktivierung der AMPK durch Adiponektin, Metformin und AICAR .....	54
3.2.2.1	Einfluss von Metformin und AICAR auf die CD163-Expression .....	55
3.2.2.2	Effekt des AMPK-Inhibitors Compound C auf die CD163-Konzentration.....	56
3.2.2.3	Ausschluss zytotoxischer Effekte von Compound C anhand der Bestimmung von LDH und PARP .....	57
<b>3.3</b>	<b>Einfluss freier Fettsäuren und einer Cholesterindepletion auf die CD163 – Expression in Monozyten .....</b>	<b>58</b>
3.3.1	Auswirkung von Palmitin- und Ölsäure auf das monozytäre CD163 .....	58
3.3.2	Einfluss einer kombinierten Stimulation primärer Monozyten mit Fettsäuren und Adiponektin .....	59
3.3.3	Einfluss von Cyclodextrin und Lovastatin auf die monozytäre CD163-Expression	61



<b>3.4</b>	<b>Auswirkung von Adiponektin auf CD163 in Monozyten von Typ 2 Diabetikern, normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen.....</b>	<b>62</b>
3.4.1	Veränderung der CD163-Expression unter dem Einfluss von Adiponektin in den drei Kollektiven CG1, CG2 und T2D .....	62
3.4.2	Lösliches CD163 im Überstand primärer Monozyten von Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen .....	65
3.4.3	Vergleich der Konzentration an gelöstem CD163 mit der systemischen IL 6-Konzentration und anthropometrischen Daten der Spender .....	66
3.4.4	Analyse der sCD163-Konzentration im Serum von Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen und normalgewichtigen Spendern.....	66
3.4.5	Lösliches CD163 im Vergleich mit wichtigen Kenngrößen des Cholesterinstoffwechsels und Korrelation mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung.....	69
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>70</b>
<b>4.1</b>	<b>Regulation der CD163-Expression durch Adiponektin.....</b>	<b>70</b>
4.1.1	CD163 – ein Hämoglobin-Scavengerrezeptor mit antiinflammatorischen Eigenschaften.....	70
4.1.2	Reduktion der CD163-Proteinexpression in Monozyten durch das Hormon Adiponektin .....	70
4.1.3	Effekt von Adiponektin auf die lösliche Form von CD163.....	71
4.1.4	Auswirkung von Adiponektin auf die membrangebundene und lösliche Form von CD163 in differenzierten Makrophagen nach IL10-Stimulation .....	72
<b>4.2</b>	<b>MAP Kinase und AMPK als mögliche Zielproteine in der Adiponektin-vermittelten Reduktion der CD163-Expression in Monozyten.....</b>	<b>73</b>
4.2.1	Der MAP Kinase-Weg als möglicher Signalweg der Adiponektin-vermittelten CD163-Reduktion.....	73
4.2.2	Aktivierung der AMPK durch Adiponektin, Metformin und AICAR .....	74
4.2.2.1	Reduktion von CD163 durch Adiponektin, Metformin und AICAR .....	75
4.2.2.2	Der AMPK-Weg als möglicher Signalweg der Adiponektin-vermittelten CD163-Reduktion .....	75

---

<b>4.3</b>	<b>Freie Fettsäuren als wichtige Komponenten in der Entstehung von Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2 und atherosklerotischen Gefäßerkrankungen bei übergewichtigen Menschen .....</b>	<b>76</b>
4.3.1	Beeinflussung der systemischen Adiponektinkonzentration durch freie Fettsäuren .....	77
4.3.2	Reduktion der CD163-Proteinexpression in Monozyten durch freie Fettsäuren ....	77
4.3.3	Auswirkung einer Cholesterindepletion mittels Lovastatin und Cyclodextrin auf die monozytäre CD163-Expression .....	78
<b>4.4</b>	<b>CD163 in den drei Spenderkollektiven Typ 2 Diabetiker, übergewichtige und normalgewichtige Kontrollen .....</b>	<b>78</b>
4.4.1	Das Fettgewebe - ein endokrines Organ mit einer Vielfalt an Effekten auf den gesamten Organismus .....	78
4.4.2	Veränderte Sekretion des Hormons Adiponektin bei Diabetes mellitus Typ 2 und Übergewicht im Vergleich zu normalgewichtigen, gesunden Kontrollen.....	79
4.4.3	CD163-Expression in Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 sowie übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen .....	80
4.4.4	Lösliches CD163 in den drei Studienkohorten Typ 2 Diabetiker, übergewichtige und normalgewichtige Kontrollen im Vergleich .....	81
4.4.5	Effekt von Adiponektin auf das monozytäre CD163 in den drei Kohorten Typ 2 Diabetiker, übergewichtige und normalgewichtige Kontrollen .....	81
4.4.6	Einfluss von IL 6 auf die lösliche Form von CD163 bei Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen .....	81
4.4.7	Lösliches CD163 im Serum von Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Kontrollen im Vergleich zu normalgewichtigen, gesunden Spendern.....	82
4.4.8	Korrelation von sCD163 und anthropometrischen Daten der Spender.....	83
4.4.9	Einfluss einer koronaren Herzerkrankung auf die Konzentration an gelöstem CD163 .....	83
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>95</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ACRP30	<i>Adipocyte Complement-Related Protein of 30 kDa</i>
AdipoR1	Adiponektinrezeptor 1
AdipoR2	Adiponektinrezeptor 2
AI CAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1-4-Ribofuranosid
AK	Antikörper
AMP	<i>Adenosin-5-Monophosphate</i>
AMPK	<i>Adenosine 5' Monophosphate – Activated Protein Kinase</i>
Apm	Adiponektin
apM1	<i>Adipose Most abundant gene transcript 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
Au	<i>arbitrary units</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	<i>Body Mass Index</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
C	Compound C
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CG1	Übergewichtige Kontrollen
CG2	Normalgewichtige Kontrollen
CO	Kohlenstoffmonoxid
Cp	<i>Crossingpoint</i>
CRP	C-reaktives Protein
CSF-1	<i>Colony-Stimulating-Factor-1</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
Cu	Kupfer
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DANN	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid

---

ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated Kinasen</i>
et al.	et alii (lat.: und andere)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
h	hora (lat.: Stunde)
Hb	Hämoglobin
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HMW	<i>High Molecular Weight Form</i>
HO-1	Hämoxygenase-1
Hp	Haptoglobin
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horseradish Peroxidase</i> )
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL 10	Interleukin 10
IL 1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL 6	Interleukin 6
IMP	Inosinmonophosphat
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight Form</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MCSF-1	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor 1</i>
Metf	Metformin
Min	Minute

---

MMW	<i>Medium Molecular Weight Form</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor-<math>\kappa</math>B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
N-terminal	Amino-terminal
OA	Ölsäure
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PA	Palmitinsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBMC	Periphere Blutmonozyten ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )
PBS	Phosphatpuffer ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPAR- $\alpha$	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha</i>
PPAR- $\gamma$	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rev	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
sCD163	Lösliches ( <i>soluble</i> ) CD163
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SRCR	Cysteinreicher Scavengerrezeptor ( <i>Scavenger Receptor Cystein – Rich</i> )
T2D	Typ 2 Diabetiker
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Trispuffer ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
TEMED	N, N, N', N' , - Tetramethylethylendiamin
TG	Triglycerid
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha

---

Tris	Tris(hydroxymethyl-) aminomethan
Uni	<i>Universe</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WHR	<i>Waist-to-hip-ratio</i>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Metabolische Syndrom und seine Entstehung

### 1.1.1 Definition und Prävalenz des Metabolischen Syndroms

Das Metabolische Syndrom bezeichnet das gleichzeitige Vorliegen verschiedener Risikofaktoren, die in ihrer Gesamtheit aber auch als voneinander unabhängige Einzelkomponenten mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert sind.[1] Diese erstmalig 1988 von Gerald Reaven als Syndrom X bezeichnete Funktionsstörung beinhaltet im Wesentlichen vier Hauptkomponenten, die sich aus einer abdominal betonten Adipositas, einer Glukoseintoleranz, einer arteriellen Hypertonie und einer Dyslipidämie in Form eines erhöhten Triglyzeridspiegels sowie einer Erniedrigung des *High Density Lipoprotein* (HDL) im Serum zusammensetzen. [2] Die genaue Abgrenzung dieser vier Hauptrisikofaktoren wurde jedoch von den einzelnen Gesundheitsorganisationen unterschiedlich bewertet, wobei insbesondere die Quantifizierung der Adipositas Anlass zur Diskussion gab. Die aktuellste Charakterisierung des Metabolischen Syndroms erfolgte 2005 durch die *International Diabetes Federation* (IDF), welche das Messen des Bauchumfanges zur Bestimmung der Adipositas voraussetzte, während sich die Weltgesundheitsorganisation (WHO) weiterhin auf die *Waist-to-hip-ratio* (WHR) beruft. [3] Aufgrund dieser Unstimmigkeiten ist es kaum möglich, eine genaue Aussage über die Prävalenz des Metabolischen Syndroms zu treffen. Laut WHO steigt sie jedoch mit zunehmendem Alter an und ist dabei vom Geschlecht und der jeweiligen ethnischen Zugehörigkeit abhängig. [2] Insgesamt muss dem Metabolischen Syndrom eine wachsende Bedeutung in unserem Gesundheitssystem zugemessen werden, da seine Prävalenz in den letzten Jahren stark zugenommen hat und seine gesundheitlichen Konsequenzen weitreichend sind. Adipositas kann dabei als Wegbereiter des Metabolischen Syndroms gesehen werden, da diese positiv mit der Entwicklung der übrigen Komponenten des Metabolischen Syndroms korreliert. [3-4]

## **1.1.2 Adipositas als wichtige Komponente in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen**

### **1.1.2.1 Definition und Prävalenz von Adipositas**

Zur Definition von Übergewicht und Adipositas wird in erster Linie der so genannte *Body Mass Index* (BMI) verwendet. Dieser errechnet sich durch den Quotienten aus Körpergewicht in Kilogramm und Körpergröße in Meter zum Quadrat. In der Literatur wird Normalgewicht durch einen BMI von 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup> definiert, während ein BMI von 25,0-29,9 kg/m<sup>2</sup> als Übergewicht bezeichnet wird. Von einer Adipositas spricht man ab einem BMI von 30 kg/m<sup>2</sup>. [5]

Im Rahmen einer internationalen Konferenz der WHO 2006 wurde erhöhtes Körpergewicht als eines der schwerwiegendsten Probleme für die öffentliche Gesundheit des 21. Jahrhunderts deklariert. [6] In erster Linie haben Überernährung und Bewegungsmangel in den letzten Jahrzehnten dazu geführt, dass die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas in den industrialisierten Ländern der Welt stetig gestiegen ist und erhöhtes Körpergewicht als Erkrankung zunehmende Bedeutung erlangt hat. Die Bundesrepublik Deutschland zählt dabei zu den Staaten mit dem höchsten Anteil übergewichtiger und adipöser Menschen in Europa. [6] Laut einer Studie des Robert-Koch-Instituts von 2004 sind im Durchschnitt 58,8% der deutschen Erwachsenen übergewichtig und 18,1% als adipös einzustufen. Besonders besorgniserregend ist dabei die Tatsache, dass sich Übergewicht auch bei Kindern und Jugendlichen mit alarmierender Geschwindigkeit ausbreitet. [7] Aus diesem Grund versuchen die WHO sowie viele andere Gesundheitsorganisationen, das Gesundheitsbewusstsein der Menschen zu stärken und dieser Entwicklung Einhalt zu gebieten. [6]

### **1.1.2.2 Das Fettgewebe als wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort und der systemischen Inflammation**

Bereits Hippokrates stellte im 4. Jahrhundert v. Chr. fest, dass der plötzliche Herztod häufiger bei übergewichtigen Personen auftrat als bei schlanken Menschen.

Lange Zeit wurde angenommen, dass eine Hypercholesterinämie alleinige Hauptursache für das Entstehen von kardiovaskulären Erkrankungen darstellt. Neuere Studien jedoch belegten, dass ein entscheidender Faktor in der Pathogenese atherosklerotischer Schäden in einer systemischen Entzündungsreaktion des



Körpers zu sehen ist. Dies zeigte sich in erster Linie daran, dass eine signifikante Erhöhung von inflammatorischen Markermolekülen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen zu beobachten war. Dieser Anstieg von systemischen Entzündungsmediatoren konnte auch bei anderen mit Adipositas assoziierten Erkrankungen, wie etwa dem Diabetes mellitus Typ 2, nachgewiesen werden. [8]

Laut Berger A. und Scherer P. leistet das humane Fettgewebe einen wichtigen Beitrag in der Infektabwehr des angeborenen Immunsystems. Es enthält nicht nur eine Vielzahl von Makrophagen, die eine entscheidende Rolle im inflammatorischen Geschehen spielen, sondern auch Adipozyten, die über bestimmte Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche in der Lage sind, sehr sensitiv körperfremde Antigene zu detektieren und auf inflammatorische Zytokine zu reagieren. Über die Aktivierung dieser Rezeptoren werden verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt, die schließlich zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Akut-Phase-Proteinen, wie z.B. Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL 6), C-reaktives Protein (CRP), *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1), *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), P-Selektin, Serumamyloid A3, Fibrinogen oder Angiotensinogen, führen. Adipozyten sind damit ähnlich wie Makrophagen an der Entstehung systemischer Inflammation beteiligt. [4, 8] Eine Zu- oder Abnahme des weißen Fettgewebes führt dabei zu einer signifikanten Veränderung der endokrinen und metabolischen Eigenschaften humaner Adipozyten. Wie mehrere Studien belegen, ist eine Erhöhung des BMI mit einer signifikant vermehrten Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Adipozyten und Makrophagen des Fettgewebes assoziiert. So ließ sich im Mausmodell eine positive Korrelation zwischen einer Gewichtszunahme der Tiere und einer deutlich erhöhten Expression von mRNA-Transkripten inflammatorischer Gene des Fettgewebes nachweisen. Ein Gewichtsverlust hingegen führte zu einer signifikanten Verminderung der Konzentration systemisch zirkulierender inflammatorischer Moleküle im Serum. [4, 8] Adipositas per se, insbesondere eine Ansammlung von Fettgewebe im abdominalen Bereich, stellt damit eine chronische, geringgradige Inflammation des Körpers dar, die eng mit der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 verbunden ist. [9]

### 1.1.2.3 Die Rolle von Makrophagen in der Adipositas und damit assoziierte Erkrankungen

Neben Adipozyten enthält das humane Fettgewebe eine Reihe weiterer Zellen, wie Fibroblasten, Makrophagen und Präadipozyten. [8]

Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Anteil CD14- und CD31-positiver Makrophagen 5-10% der Stromazellen des Fettgewebes. Wie Weisberg et al. zeigen konnten, korreliert die Anzahl von Makrophagen des Fettgewebes positiv mit dem BMI und der Größe der einzelnen Adipozyten. Bei adipösen Patienten kann ihr Anteil an den Zellen des Fettgewebes auf über 60% ansteigen, wobei viszerales Fettgewebe eine deutlich höhere Zahl an Makrophagen aufweist als subkutanes Fett. [8-11] Während man früher annahm, dass die Akkumulation von Makrophagen im Fettgewebe übergewichtiger Personen durch eine Differenzierung von Präadipozyten zu Makrophagen zustande kommt, konnte in neueren Studien belegt werden, dass eine vermehrte Infiltration des Fettgewebes durch Monozyten und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark erfolgt. Die Ursache hierfür ist in einer erhöhten Produktion von *Monoocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1), einem für Monozyten und Makrophagen spezifischen Chemokin, und von *Colony Stimulating Factor-1* (CSF-1), einem primären Regulator der Makrophagendifferenzierung, im Fettgewebe zu sehen. [9, 11] Neben den Adipozyten tragen Makrophagen zur Synthese proinflammatorischer Faktoren bei und sind damit maßgeblich an der Entwicklung der systemischen Inflammation beteiligt. Makrophagen sind dabei als Hauptquellen für die TNF  $\alpha$ - und IL 6-Produktion anzusehen, welche in direkter Relation zur Insulinresistenz stehen. Über autokrine und parakrine Signalwege wird dabei synergistisch die inflammatorische Aktivität der jeweils anderen Zellart erhöht. [8]

Wie bereits erwähnt, ist ein erhöhter BMI und die damit verbundene systemische Entzündungsreaktion maßgeblich mit der Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert. Die Pathogenese diabetischer Komplikationen wie etwa die Entstehung einer Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie sowie einer Atherosklerose ist dabei vornehmlich auf eine verstärkte lokale Akkumulation aktivierter Makrophagen zurückzuführen. Der erhöhte Glukosespiegel, oxidiertes *Low Density Lipoprotein* (LDL) und andere Faktoren der diabetischen Stoffwechsellage führen zur Phagozytenaktivierung und somit zur lokalen Gewebeschädigung durch Produktion inflammatorischer und zytotoxischer Metabolite. Nach Tesch G.H. korreliert die

Schwere der Hyperglykämie mit dem Ausmaß der durch Makrophagen induzierten lokalen Gewebeschädigung. [12-13]

## 1.2 Das menschliche Fettgewebe als endokrines Organ

Das menschliche Fettgewebe stellt, wie bereits angedeutet, nicht nur ein passives Organ dar, welches überschüssige Energie speichert und der Wärmeisolation dient, vielmehr produziert es als aktive endokrine Einheit eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen. Diese als Adipokine bezeichneten Stoffe beinhalten eine große Anzahl an verschiedenen Metaboliten, Hormonen und Zytokinen, wobei neben den bereits genannten Faktoren auch Leptin, Adipsin, Visfatin sowie Adiponektin hinzuzufügen sind. [9, 14]

### 1.2.1 Das Adipokin Adiponektin

Das Hormon Adiponektin wurde erstmals 1996 von einer Forschungsgruppe um Maeda entdeckt und als *adipose Most abundant gene transcript 1* (apM1) bzw. aufgrund seiner Strukturhomologie zum Komplementfaktor C1q auch als *Adipocyte Complement-Related Protein of 30 kDa* (ACRP30) bezeichnet. [15] Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel gelangte das Adiponektin in den letzten Jahren immer mehr in den Mittelpunkt der Erforschung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2.

### 1.2.2 Synthese und Regulation von Adiponektin

Das Adipokin Adiponektin ist charakterisiert als ein Peptidhormon mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa und wird ausschließlich von differenzierten Adipozyten des Fettgewebes gebildet. Seine Synthese wird dabei insbesondere während des Reifungsprozesses von Präadipozyten zu entdifferenzierten Adipozyten durch *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ* (PPAR-γ) induziert. [16] In humanem Serum liegt Adiponektin in einer Konzentration von etwa 3 bis 30 µg/ml vor. Der Adiponektinspiegel wird von dem jeweils vorherrschenden Körperfettanteil und den damit verbundenen krankhaften Veränderungen beeinflusst. [17]

### 1.2.3 Biochemische Charakterisierung

Das Peptidhormon Adiponektin besteht aus insgesamt 247 Aminosäuren und weist eine dreigeteilte Struktur auf. N-terminal findet sich ein Signalpeptid sowie eine sich anschließende kollagene Einheit, während das C-terminale Ende von einer globulären Domäne gebildet wird. Das humane Adiponektin ähnelt damit in seinem strukturellen Aufbau dem Komplementfaktor C1q. [16] Seine Kodierung erfolgt durch das Gen APM1 auf dem Chromosomenabschnitt 3q27. [18]

Für das humane Adiponektin existieren eine Reihe verschiedener Isoformen, die sich hinsichtlich ihrer Bioaktivität unterscheiden. [16] Grundeinheit bildet dabei eine homotrimere Form, welche auch als *Low Molecular Weight Form* (LMW) bezeichnet wird. Basierend auf dieser trimeren Form können sich mehrere Homotrimere zu multimeren Isoformen zusammenlagern. So entsteht durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Kollagendomänen zweier Homotrimere ein Hexamer, die sog. *Medium (oder Middle) Molecular Weight Form* (MMW) des Hormons mit einem Molekulargewicht von 180 kDa. Auch oligomere Formen mit einer Größe von mehr als 400 kDa sind bekannt. Sie setzen sich aus vier bis sechs Homotrimeren zusammen und werden demzufolge als *High Molecular Weight Form* (HMW) bezeichnet. Zusammen stellen diese Komplexe nahezu 0,01% des gesamten Serumproteins dar. [16, 19]

### 1.2.4 Charakterisierung der Adiponektinrezeptoren

Für das humane Adiponektin sind drei verschiedene Rezeptoren geläufig. 2003 gelang die Identifizierung der Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2. Neben diesen wurde T-Cadherin als weiterer Rezeptor für Adiponektin entdeckt, welches nur die HMW-Form des Peptidhormons bindet. [16]

Die strukturelle Beschaffenheit der beiden Rezeptoren AdipoR1 und 2 in Form von sieben Transmembran-Domänen lässt eine Zugehörigkeit zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren vermuten. Da sich ihr C-terminales Ende extrazellulär und ein langes N-terminales Segment intrazellulär befinden, werden sie einer neuen Familie von Membranrezeptoren zugeordnet. Die Expression der beiden Rezeptoren beim Menschen erfolgt in erster Linie in der Leber, im Muskel, im Fettgewebe und im Pankreas. [20-21] Wie Kadowaki et al. im Mausmodell zeigen konnten wird über AdipoR1 die *Adenosine 5' Monophosphate – Activated Protein Kinase* (AMPK)

aktiviert, wodurch in der Leber eine verminderte Expression von Enzymen der Glukoneogenese und der Lipogenese bewirkt wird. Über AdipoR2 hingegen wird der *Peroxisome Proliferator activated Rezeptor  $\alpha$*  (PPAR  $\alpha$ ) stimuliert, was eine Reduktion der Triglyzeridspeicher in der Leber zur Folge hat. [20]

### 1.2.5 Regulation und funktionelle Bedeutung von Adiponektin

Adiponektin besitzt antidiabetische, antiatherosklerotische und antiinflammatorische Effekte. Eine Veränderung der Adiponektinplasmakonzentration ist deshalb häufig mit dem Metabolischen Syndrom assoziiert. [16]

#### 1.2.5.1 Systemisches Adiponektin und Körpergewicht (BMI)

Da Adiponektin ausschließlich von Adipozyten produziert wird, scheint es nicht verwunderlich, dass sich Veränderungen der Fettgewebssmasse auf die Adiponektinplasmakonzentration auswirken. Ein pathologisch erhöhtes Körpergewicht, wie dies für Patienten mit Adipositas, Typ 2 Diabetes mellitus oder dem Metabolischen Syndrom häufig zutrifft, führt nicht zu einer vielleicht erwarteten Zunahme, sondern zu einer signifikanten Verminderung der Adiponektinkonzentration im Serum. [17, 22] Diese negative Korrelation zwischen erniedrigtem Adiponektin im Serum und erhöhtem BMI bzw. einer erhöhten Körperfettmasse wird durch die proinflammatorischen Zytokine TNF  $\alpha$  und IL 6 vermittelt, welche bei Erkrankungen aus oben genanntem Formenkreis in erhöhtem Maße freigesetzt werden. [23-24]

Ein Gewichtsverlust und die damit verbundene Reduktion der Fettmasse um mehr als 20% hat einen deutlichen Anstieg der Serumkonzentration sowie der mRNA-Expression von humanem Adiponektin zur Folge. [25] Für die Beeinflussung der Adiponektinkonzentration spielt nicht nur die absolute Höhe des Körperfettanteils eine Rolle, sondern auch die Verteilung des Fettgewebes im Körper. So besteht eine merkliche negative Korrelation zu einer verstärkten Akkumulation des Fettgewebes im intraabdominellen Bereich. [26] Des Weiteren zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Adiponektinkonzentration zwischen den Geschlechtern. So weisen Frauen einen signifikant höheren Adiponektinspiegel auf, obwohl sie im Vergleich zu Männern einen physiologisch größeren Körperfettanteil besitzen. Es wird deshalb vermutet, dass noch weitere Faktoren an der Regulation dieses Hormons beteiligt sind. [14, 27]

### **1.2.5.2 Die Rolle von Adiponektin bei Diabetes mellitus Typ 2**

Wie in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte, verbessert Adiponektin die Insulinsensitivität und wirkt sich damit positiv auf die Glukosehomöostase des gesamten Körpers aus. Dieser Effekt kommt durch eine Verminderung der basalen sowie der insulinabhängigen hepatischen Glukoneogenese und einer gesteigerten Lipidoxidation zustande. Eine Hypoadiponektinämie korreliert folglich mit einer zunehmenden Insulinresistenz des Körpers. [16, 18] Abbasi et al. konnten zeigen, dass die Adiponektinkonzentration bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 unabhängig von der Adipositas erniedrigt war. Die genaue Ursache, die dieser Beobachtung zugrunde liegt, ist bis heute leider unbekannt. Als mögliche Ursachen des verminderten Adiponektinspiegels kommen eine genetische Disposition, die Insulinresistenz oder das Überangebot an Glukose in Frage. Dennoch lässt sich daraus schlussfolgern, dass Adiponektin eine bedeutende Rolle in der Regulation des Glukosehaushaltes besitzt und als ein wichtiger Insulinsensibilisator des Körpers fungiert. [28]

### **1.2.5.3 Die Rolle von Adiponektin bei der Entstehung von Atherosklerose**

Sowohl im Tiermodell als auch in vitro konnte in neueren Studien nachgewiesen werden, dass Adiponektin protektive Eigenschaften bezüglich der Entwicklung von Gefäßerkrankungen zeigt. So wurde in Adiponektin knock out Mäusen ein signifikant höheres Risiko für Gefäßschäden nachgewiesen. [29] Zudem konnte in vitro gezeigt werden, dass Adiponektin die Produktion vaskulärer Adhäsionsfaktoren herunterreguliert, die Bildung von Schaumzellen sowie die Migration glatter Muskelzellen inhibiert und antiinflammatorische Effekte auf Makrophagen ausübt. [30-33] Eine Hypoadiponektinämie ist somit nicht nur mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert, sondern weist auch ein erhöhtes Vorkommen von Atherosklerose auf. Des Weiteren konnten für das Adiponektin antiatherogene Effekte durch Modulation des Lipidmetabolismus nachgewiesen werden. Die Konzentration des Peptidhormons korrelierte negativ mit der Menge an Serum Triglyzeriden und LDL, während es eine positive Korrelation zu HDL aufwies. [34] Der genaue Mechanismus, wie Adiponektin den Lipidstoffwechsel beeinflusst, konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden. Im Vergleich mehrerer ethnischer Gruppen wurde jedoch gezeigt, dass Populationen mit geringerer

Konzentration an Adiponektin, wie z.B. Menschen aus Südasien, ein deutlich höheres Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 und Atherosklerose aufweisen. [35]

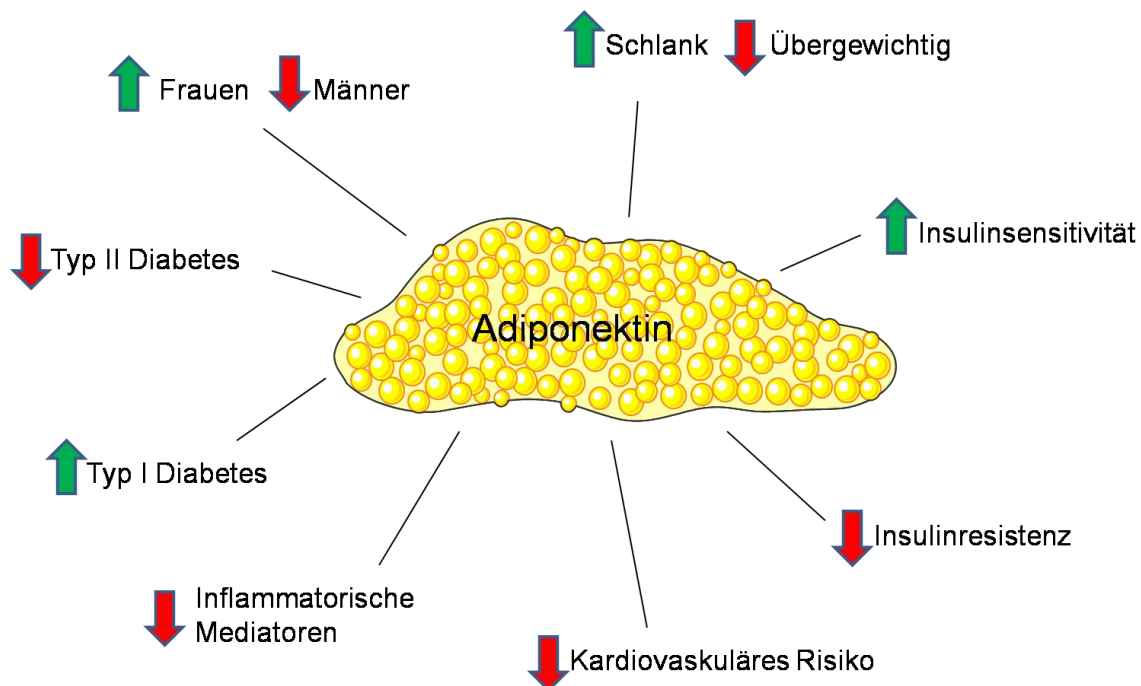


Abb. 1: Übersicht der wichtigsten Faktoren, die zu einer Hoch- oder Herabregulation von Adiponektin im Fettgewebe führen (modifiziert nach Trujillo M. E. & Scherer P. E. [16]).

#### 1.2.5.4 Beeinflussung der Funktion humaner Monozyten und Makrophagen durch das Adipokin Adiponektin

Da Monozyten bzw. Makrophagen nicht nur im Fettgewebe übergewichtiger Personen in erhöhter Zahl gefunden wurden, sondern auch an der Entstehung atherosklerotischer Gefäßläsionen und anderer diabetesassoziierter Erkrankungen maßgeblich beteiligt sind, stellte sich die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen den protektiven Eigenschaften des Hormons Adiponektin einerseits und einer möglichen Beeinflussung der Monozytenfunktion andererseits. Wie 2004 im Rahmen mehrerer Forschungsarbeiten festgestellt wurde, ist Adiponektin in der Lage, auf die Zytokinproduktion aktivierter Monozyten bzw. Makrophagen Einfluss zu nehmen. Während es die Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie IL 6, TNF  $\alpha$  und Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) hemmt, fördert es zugleich die

Freisetzung antiinflammatorischer Moleküle wie Interleukin 10 (IL 10), indem es die Translokation der *Nuclear Factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) Einheit p65, einem wichtigen Regulator der Zytokinexpression, im Zellkern reduziert. [33, 36]

Weitere Einflüsse von Adiponektin auf die Monozytenfunktion sind in der Herunterregulation des Makrophagen Scavengerreceptors-A (MSR-A), in der Phosphorylierung der AMPK, einem wichtigen Enzym der intrazellulären Energiebereitstellung, und nicht zuletzt in der Induktion der Zellapoptose zu sehen. [33, 37-39] Während diese Effekte von der biochemischen Struktur des Adiponektin unabhängig sind, zeigt lediglich die LMW-Form des Hormons antiinflammatorische Eigenschaften. Neumeier et al. zufolge reduziert trimeres Adiponektin die Lipopolysacharid (LPS)-induzierte IL 6-Produktion und stimuliert die IL 10-Sekretion, während die HMW-Form lediglich eine IL 6-Induktion in Monozyten zur Folge hat.[40] Die protektiven Eigenschaften des Hormons Adiponektin hinsichtlich der Entstehung von Inflammation, Diabetes und Atherosklerose können demnach z.T. über eine Beeinflussung der Monozytenfunktion erklärt werden, wobei unterschiedliche Adiponektinisoformen neben gemeinsamen Effekten auch jeweils eine isoformspezifische Wirkung auf humane Monozyten ausüben. [38, 40]

### **1.3 CD163 – ein monozyten- bzw. makrophagenspezifisches Oberflächenantigen**

Auf der Suche nach Differenzierungsantigenen mononukleärer Phagozyten wurden verschiedene Antikörper, darunter der polyklonale Antikörper RM3/1, eingesetzt. Das dabei detektierte Antigen war ausschließlich auf der Zelloberfläche humaner Monozyten und Makrophagen zu finden. Nach Bestimmung der Aminosäuresequenz des Proteins ergab sich eine Sequenzübereinstimmung mit dem bereits bekannten Protein M130, welches schließlich der internationalen CD-Nomenklatur zufolge als CD163 bezeichnet wurde. Dieses monozyten-/makrophagenspezifische Antigen konnte in verschiedenen Geweben des Körpers gefunden werden, so unter anderem in der roten Pulpa der Milz, in der Plazenta, der Leber, im Thymus und in Lymphknoten. Außerdem waren CD163-positive Makrophagen regelmäßig in akuten sowie chronischen inflammatorischen Prozessen, vorwiegend in der späten Phase des entzündlichen Geschehens, nachzuweisen. [41-42] Wie Büchler C. et al. herausfinden konnten, zeigen CD14/CD16-positive Zellen unter allen Monozytensubspezies die höchste Expression des Oberflächenantigens CD163.



Außerdem findet es sich in einer noch deutlich höheren Dichte auf Gewebsmakrophagen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die CD163-Expression während des Reifungsprozesses zur entdifferenzierten Zelle ansteigt. [43] Die herausragende Rolle dieser Immunzellen sowohl in der angeborenen wie auch in der erworbenen Immunantwort macht CD163 zu einem überaus interessanten Ansatzpunkt in der Erforschung regulatorischer Prozesse des Immunsystems.

### 1.3.1 Biochemische Struktur des Oberflächenmoleküls CD163

CD163 stellt ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 130 kDa dar, das ca. 25 kDa große, N-glykosidisch gebundene, mannosereiche Zucker trägt. Als transmembranäres Molekül besitzt es einen großen N-terminalen Abschnitt, ein Transmembransegment sowie einen kurzen zytoplasmatischen Anteil. [41] Aufgrund alternativen m-RNA-Splittings existieren verschiedene Isoformen von CD163, welche Veränderungen im Bereich der zytoplasmatischen und extrazellulären Abschnitte aufweisen. [43] Nach vollständiger Analyse der Aminosäuresequenz ist es schließlich gelungen, das Glykoprotein CD163 als ein Mitglied der Gruppe B der cysteinreichen Scavengerrezeptoren zu identifizieren (Abbildung 2). [41]

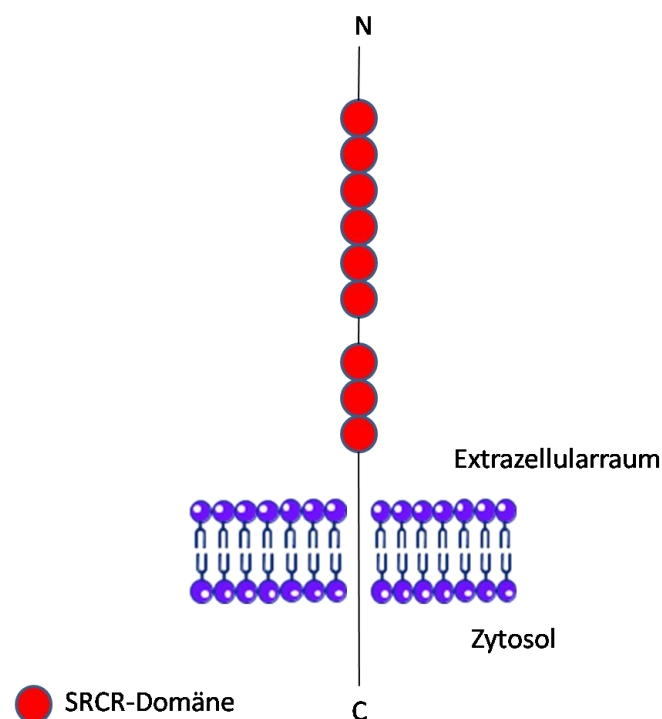


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur des CD163 auf der Oberfläche eines Monozyten/Makrophagen (modifiziert nach Kristiansen M. et al. [45]).

### 1.3.1.1 Die Familie der cysteinreichen Scavengerrezeptoren

Die Familie der cysteinreichen Scavengerrezeptoren (SRCR, engl. *Scavenger Receptor Cysteine-Rich*) stellt eine lang bekannte Proteingruppe dar, deren Vertreter in verschiedenen Organismen, von niederen wirbellosen Tieren bis hin zu hoch entwickelten Säugetieren, gefunden werden. [25] Sie setzen sich aus einzelnen Einheiten hochkonservierter Proteindomänen zusammen, wobei jede dieser Domänen wiederum aus ca. 100 bis 110 Aminosäureresten besteht. [44-45] Abhängig von der Anzahl und der Verteilung der Cysteine in den einzelnen Domänen und der genomischen Kodierung der Domänen werden zwei Gruppen von Scavengerrezeptoren unterschieden. Die SRCR-Domäne der Vertreter der Gruppe A wird von zwei Exons kodiert und enthält sechs Cysteinreste. Die SRCR-Domäne der Gruppe B wird durch ein Exon kodiert, enthält jedoch jeweils sechs bis acht Cysteinreste. Des Weiteren liegen bei Proteinen der Gruppe B mehrere Domänen in einer sich wiederholenden Reihe vor. CD163 als Mitglied der Gruppe B besteht aus insgesamt neun nacheinander geschalteten SRCR-Domänen im extrazellulären Bereich. [45-46] Als weitere bekannte Vertreter dieser Gruppe sind die Proteine WC1, CD5, CD6 sowie M160 zu nennen, welche strukturelle Ähnlichkeiten, jedoch keine funktionellen Übereinstimmungen mit CD163 aufweisen. [44, 46] Über die Funktion der cysteinreichen Scavengerrezeptoren ist nur wenig bekannt: Eine Beteiligung an der Regulation und Entwicklung der Immunantwort wird diskutiert. Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie können sowohl in einer membrangebundenen Form auf Immunzellen oder als lösliche Bestandteile des Plasmas vorliegen. [41, 45] Ebenso existiert CD163 sowohl als membrangebundenes Antigen auf der Oberfläche von mononukleären Phagozyten als auch in Form eines natürlich im Plasma vorkommenden Proteins. [47]

### **1.3.2 Funktionelle Bedeutung der membrangebundenen Form des CD163**

#### **1.3.2.1 CD163 als Hämoglobin-Scavengerrezeptor**

Erythrozyten versorgen das periphere Gewebe mit Sauerstoff; die Bindung erfolgt an das Protein Hämoglobin (Hb). [48-49] Durchschnittlich leben Erythrozyten etwa 120 Tage lang. Ihr Abbau, die sog. Blutmauserung, erfolgt hauptsächlich in der Milz, aber auch in der Leber und im Knochenmark durch das mononukleäre Phagozytensystem. [44, 50] Allerdings wird ein Teil der Erythrozyten durch mechanische Beanspruchung bereits im Blutgefäßsystem lysiert, so dass ca. 10% des Gesamthämoglobins intravaskulär freigesetzt und beseitigt werden. Im Rahmen eines Infektgeschehens sowie einer erworbenen oder angeborenen hämolytischen Erkrankung werden deutlich höhere Konzentrationen an freiem Hämoglobin beobachtet. [44, 50]

Das freigesetzte Hämoglobin, genauer gesagt dessen Globin-Anteil, wird irreversibel an das in der Leber produzierte Protein Haptoglobin (Hp) gebunden. Dessen Aufgabe besteht darin, das Hämoglobin den Monozyten bzw. Makrophagen zuzuführen, welche CD163 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und den Komplex internalisieren. Zudem enthalten diese Zellen eine hohe Konzentration des Enzyms Hämoxxygenase-1 (HO-1), einer Monooxygenase, die für den Hämabbau zuständig ist. Peripheren Blutmonozyten bzw. Makrophagen kann damit eine bedeutende Rolle bei der Entgiftung des Körpers von Hämoglobin, das vor allem bei akuten entzündlichen Prozessen in erhöhten Konzentrationen vorliegt, zugeschrieben werden. [50]

Entscheidende Voraussetzung für die Internalisierung des Hämoglobins ist dessen Bindung an Haptoglobin. Die Affinität des CD163-Rezeptors ist dabei vom molekularen Phänotyp des Haptoglobins abhängig. Im Wesentlichen werden drei Genotypen differenziert, die sich in der Kombination der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten sowie ihrem elektrophoretischen Muster unterscheiden. [44] Während die homozygote Form Hp1-1 Dimere bildet, stellen sich der heterozygote Genotyp Hp1-2 und die ebenfalls homozygote Form Hp2-2, welche insbesondere bei Mitteleuropäern häufig vorkommt, als Oligomere dar. Wie Graversen et al. zeigen konnten, bindet CD163 den Komplex aus Hämoglobin und multimerem Haptoglobin fester als die dimere Form Hp1-1, was wahrscheinlich an der höheren Anzahl an Bindungsstellen des multimeren Ligandenkomplexes liegt. [44, 51] Im Falle starker intravasaler Hämolyse wird das Haptoglobin, das zugleich als empfindlichster Marker intravaskulärer

Hämolysereaktionen gilt, schnell verbraucht und die Konzentration an freiem Hämoglobin steigt an. In solchen Situationen ist der CD163-Rezeptor in der Lage, auch freies Hämoglobin über eine niedrig affine Bindestelle ins Zellinnere aufzunehmen. Allerdings läuft dieser Vorgang extrem langsam ab: Die systemische Toxizität von freiem Hämoglobin wird so kaum verringert. [52]

Durch die Internalisierung des Hp-Hb-Komplexes wird schließlich die HO-1 aktiviert. Das Enzym spaltet den Häm-Teil des Hämoglobins an der Methinbrücke zwischen den Pyrrolringen A und B, wodurch unter Freisetzung von dreiwertigem Eisen und Kohlenmonoxid (CO) Biliverdin entsteht. [31] Liegen große Mengen an freiem Häm in der Blutzirkulation vor, steigt die Aktivität der HO-1 stark an, was wiederum mit antiinflammatorischen, antiapoptotischen und antioxidativen Effekten assoziiert ist. Diese Wirkung wird vor allem durch die Spaltprodukte der HO-1-Reaktion, nämlich Biliverdin, Ferritin, und CO, vermittelt. Da Hämoglobin in freier Form auf Grund von oxidativen Eigenschaften des Eisens seiner Hämgruppe stark toxische Wirkung besitzt, kann durch die Induktion der endogenen HO-1 und die Effekte der exogenen Abbauprodukte des Häm maßgeblich die schädliche systemische Wirkung freien Hämoglobins vermindert werden. [53-55]

Die Toxizität freien Hämoglobins steht in Verbindung mit der Pathogenese akuter sowie chronisch inflammatorischer Erkrankungen und atherosklerotischer Veränderung an Blutgefäßen, wobei oxidative Schäden an Endothelzellen, Plasmaproteinen und Lipoproteinen maßgeblich beteiligt sind. [50, 55]

Eine weitere schädliche Wirkung ist die Bindung von Stickstoffmonoxid (NO) an den roten Blutfarbstoff. Durch diese Reaktion verliert es seine Funktion als Vasodilatator, was wiederum mit arterieller Hypertension sowie einem Druckanstieg im Lungenkreislauf und daraus resultierender Rechtsherzinsuffizienz assoziiert ist. Dies kann gerade bei hämolytischen Erkrankungen, wie etwa der Sichelzellanämie, zu einer progredienten Verschlechterung der Krankheit, sogar zu tödlichen Komplikationen führen. [50, 52]

Der Mechanismus der Internalisierung des Hb-Hp-Komplexes mittels CD163 ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

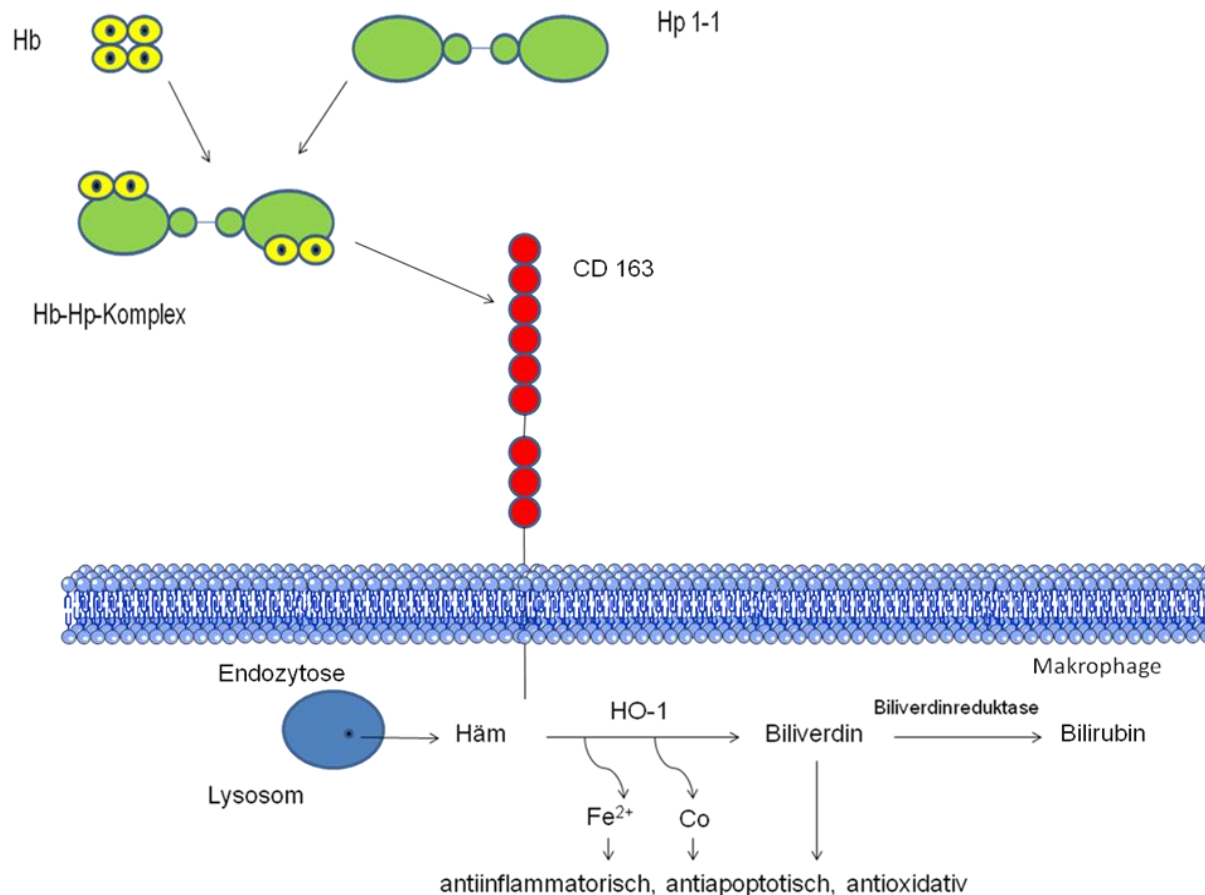


Abb. 3: Schematische Darstellung des Endozytosevorgangs eines Hb-Hp-Komplexes durch den CD163-Scavengerrezeptor. Nur der Hp1-1-Phänotyp ist dargestellt (modifiziert nach Graversen J. H. et al. [37]).

### 1.3.2.2 Die Rolle von CD163 bei der Abwehr bakterieller Infekte

Die Forschergruppe um B.O. Fabrick identifizierte das CD163-Molekül als Rezeptor für Bakterien, indem in vitro eine direkte Interaktion zwischen Bakterien und CD163 festgestellt werden konnte. Makrophagen können somit durch das CD163 auf ihrer Zelloberfläche intakte, grampositive wie auch gramnegative Bakterien erkennen und binden. [56]

Wie sich weiterhin feststellen ließ, führte die Interaktion zwischen CD163 und den Bakterien zu einer vermehrten Produktion inflammatorischer Zytokine. So wurden im Überstand kultivierter THP-1-Zellen, die über eine Dauer von vier Stunden mit den Bakterien *Streptokokkus mutans* und *Escherichia coli* stimuliert wurden, deutlich erhöhte Konzentrationen an TNF  $\alpha$  gemessen. CD163 kommt folglich eine Rolle in der erregerspezifischen Infektabwehr zu. [56]

---

### **1.3.2.3 Regulation der CD163-Expression durch pro- und antiinflammatorische Stimuli**

Die Expression von CD163 auf der Zelloberfläche sowie die Bildung von CD163-mRNA spiegeln den Ablauf eines inflammatorischen Geschehens wider und werden maßgeblich von dem jeweils vorherrschenden Zytokinmilieu beeinflusst. Zytokine sind humorale Botenstoffe des Körpers, die von unterschiedlichsten Blut- und Gewebezellen als Reaktion auf lokale, hochspezifische Reize produziert werden und eine bedeutende Rolle in der Steuerung der immunologischen Abwehrreaktion spielen. Demzufolge wird für das monozyten-/makrophagenspezifische CD163 eine wichtige regulatorische Rolle im Rahmen des Infektgeschehens postuliert. [57]

#### **1.3.2.3.1 Herabregulation der CD163-Expression**

Unmittelbar nach Eindringen eines Fremdstoffes oder nach einer Gewebsverletzung werden von Zellen der unspezifischen Abwehr proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet. [58] Als stärkster proinflammatorisch wirksamer Mediator gilt dies bezüglich das LPS, welches einen Bestandteil der äußeren Bakterienmembran gramnegativer Keime bildet und bei bakteriellen Infekten ins Blut freigesetzt wird. Als Reaktion auf diesen proinflammatorischen Reiz des LPS kommt es zu einer deutlichen Verminderung der CD163-mRNA als auch dessen Antigendichte auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen. Eine signifikante Herabregulation des CD163 konnte gleichermaßen nach Inkubation der Zellen mit weiteren proinflammatorischen Mediatoren wie IFN  $\gamma$  oder TNF  $\alpha$  gezeigt werden. [23, 57]

Der Überschuss an proinflammatorischen Zytokinen in der frühen Phase der Entzündung und die daraus resultierende Verminderung der CD163-Expression könnte die Abwesenheit von CD163-positiven Zellen in der frühen Inflammation erklären. [23]

Ebenfalls zu einer Herabregulation des CD163 führt das Immunsuppressivum Cyclosporin A [23, 41, 59] sowie eine Stimulation von *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) mit der proinflammatorischen Substanz Phorbolester Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA). [24]

### **1.3.2.3.2 Hochregulation der CD163-Expression**

Im Rahmen der Infektabwehr werden neben proinflammatorischen Zytokinen Mediatoren gebildet, die der Kontrolle der Entzündungsreaktion dienen und den Körper vor überschießender Inflammation schützen. Als wichtiger Vertreter der antiinflammatorischen Zytokine ist hierbei das IL 10 zu nennen, welches aktivierte Makrophagen hemmt und damit im Sinne einer negativen Rückkopplung der Limitierung der Entzündungsreaktion dient. [58]

Dieser antiinflammatorische Reiz des IL 10 in der späten Phase der Inflammation führt zu einer deutlichen Induktion der CD163-Expression. In vitro konnte bereits nach einer Inkubationsphase von nur zwei Stunden sehr eindrücklich eine erhöhte CD163-mRNA-Konzentration nachgewiesen werden; die CD163-Oberflächenexpression ist um den Faktor drei im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen angestiegen. [23, 59] Auch IL 6, ein multifunktionales Zytokin, das neben antiinflammatorischen auch proinflammatorische Effekte zeigt, hat zu einer deutlichen Induktion der CD163-Antigendichte auf der Zelloberfläche geführt, wenngleich die CD163-mRNA nicht wesentlich beeinflusst worden ist. [23] Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass CD163 eine herausragende Funktion in der späten, antiinflammatorischen Phase der Infektabwehr einnimmt und zur Beruhigung des Entzündungsgeschehens beiträgt. [23, 57, 59]

Als eine weitere wichtige Substanzklasse, welche eine Hochregulation des CD163 bewirkt, sind Glukokortikoide zu nennen. [23, 41, 59] Wie Högger et al. zeigen konnten, führt eine Stimulation von peripheren Blutmonozyten mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason für 48 Stunden zu einem signifikanten Anstieg sowohl der Antigendichte auf der Zelloberfläche als auch der Anzahl an CD163-positiven Zellen. [4] Selbiges konnte ebenso in vivo nach subkutaner Injektion des Steroidhormons Kortisol beobachtet werden. Der Anteil CD163-positiver Blutmonozyten stieg innerhalb von sechs Stunden deutlich an. [23, 41]

Eine Zusammenfassung der Einflussfaktoren auf die CD163-Expression auf der Oberfläche von Makrophagen ist in Abbildung 4 dargestellt.

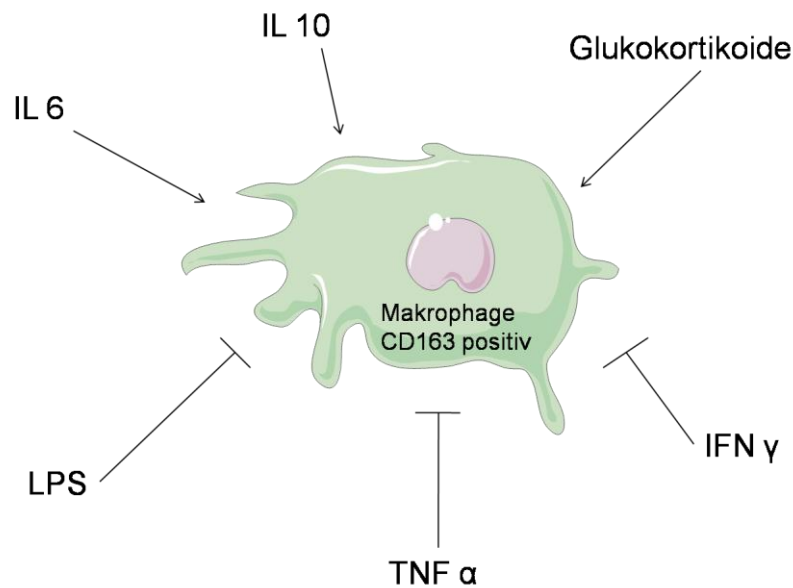


Abb. 4: Schematische Darstellung der Einflussfaktoren auf die CD163-Expression auf der Zelloberfläche von Makrophagen.

#### 1.3.2.3.3 CD163 als Mediator der antiinflammatorischen Immunregulation

In Zusammenschau der bisher gewonnenen Erkenntnisse kann festgehalten werden, dass CD163 neben seiner Funktion als Hämoglobin-Scavengerrezeptor eine weitere wichtige antiinflammatorische Funktion in der Infektabwehr zuteil wird, da antiinflammatorische Zytokine wie IL 10, IL 6 oder Steroide die CD163-Expression deutlich induzieren, während proinflammatorische Signale zu einer merklichen Suppression führen. Die Regulation dieses monozyten-/makrophagenspezifischen Glykoproteins durch verschiedene Zytokine demonstriert damit anschaulich, dass Zellen der angeborenen Abwehr in der Lage sind, unterschiedlich auf die Signale des jeweils vorherrschenden Zytokinmilieus zu reagieren. Die Expression von CD163 ist somit ein sorgfältig regulierter Bestandteil der Infektabwehr und verdeutlicht dessen wichtige Funktion in der späten antiinflammatorischen Phase der angeborenen Immunantwort.

#### 1.3.3 Die lösliche Form des Oberflächenmoleküls CD163 (sCD163)

Neben der membrangebundenen Form konnte auch eine lösliche Variante des CD163 nachgewiesen werden. Wie Moller et al. zeigen konnten, stellt das ungebundene CD163 ein natürlich im Plasma vorkommendes, lösliches Protein dar, das bei gesunden Menschen in einer Konzentration von durchschnittlich 1,87 mg/l (Schwankungsbereich 0,73-4,69 mg/l) vorliegt. [47]



### 1.3.3.1 Generierung der löslichen Form

Zur Entstehung des sCD163 kommt es durch Abspaltung des Hämoglobin-Scavengerrezeptors von der Zelloberfläche, ein Vorgang, der auch unter physiologischen Bedingungen konstant stattfindet und so ein Maß für die generelle CD163-Oberflächenexpression darstellt. [24, 47] Dieser Mechanismus wird allgemein als „*Ectodomain Shedding*“ bezeichnet, worunter man die proteolytische Freisetzung der extrazellulären Domäne transmembranärer Proteine versteht. Die Abspaltung dieser Ectodomänen führt zur Bildung biologisch aktiver löslicher Formen der Zellmembranproteine. [24] Die im Plasma vorliegende Form des CD163 weist eine Größe auf, die in etwa dem extrazellulären Anteil bestehend aus den neun SRCR-Domänen entspricht, während das Transmembransegment und der zytoplasmatische Anteil fehlen. [24, 47]

Ein derartiges Abspalten des CD163 von der Zelloberfläche konnte erstmals von Droste et al. beschrieben werden, die in vitro eine Herabregulation der CD163-Oberflächenexpression durch Inkubation der Zellen mit dem proinflammatorischen Stimulans PMA induzieren konnten. Wie sich in durchflusszytometrischen Untersuchungen feststellen ließ, kommt es unmittelbar nach dem Abfall der membrangebundenen CD163-Konzentration zu einem signifikanten Anstieg der löslichen Form im Überstand PMA-stimulierter Zellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es bereits innerhalb einer Stunde nach PMA-Applikation zu einer Reduktion der Oberflächendichte kommt. [24]

Zu einem deutlichen Anstieg der Plasmakonzentration an löslichem CD163 kommt es auch nach einer Stimulation peripherer Blutmonozyten bzw. Makrophagen mit LPS. In vitro wie in vivo konnten Hintz et al. für das LPS darlegen, dass es zu einer Abspaltung von CD163 von der Zelloberfläche aktivierter Monozyten bzw. Makrophagen kommt, welche in vitro bereits innerhalb von 15 Minuten nach LPS-Applikation zu einer Reduktion der Oberflächendichte führte. [60] Der Abfall des membrangebundenen Anteils bzw. die Erhöhung der Konzentration des löslichen CD163 erreichten in vivo Maximalwerte ca. zwei Stunden nach experimentell induzierter Endotoxämie. Dieser rasche Anstieg der ungebundenen Form als unmittelbare Folge einer Endotoxinapplikation lässt die Vermutung zu, dass die Bildung von löslichem CD163 eine Akutreaktion des Körpers auf einen Infekt darstellt. Der eigentliche Spaltvorgang erfolgt aller Wahrscheinlichkeit nach durch eine Metalloproteinase, welche durch LPS aktiviert wird. [60] In den darauf folgenden

24 bis 72 Stunden kommt es schließlich zu einer kompletten Erneuerung des Oberflächen-CD163 in deutlich höheren Konzentrationen, als dies auf unstimulierten Monozyten zu finden ist. Da eine Stimulation mit LPS zu einer erhöhten Bildung von IL 10 und IL 6 führt, lässt sich dadurch die Hochregulation der CD163-Oberflächenexpression erklären. Die Gesamtzahl an Monozyten bleibt dabei unbeeinflusst. [57, 60]

### **1.3.3.2 Bedeutung und Funktion des löslichen CD163**

Zu einer vermehrten Entstehung des löslichen Hämoglobin-Scavengerrezeptors kommt es in vitro nach Stimulation von Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen, in vivo als Reaktion des Immunsystems auf einen inflammatorischen Reiz. Da sCD163 in erhöhten Konzentrationen sowohl bei akuten als auch chronischen Erkrankungen gefunden wurde, kam man zu der Auffassung, dass ein vermehrtes Abspalten von CD163 mit erhöhter Leukozytenaktivität und -proliferation korreliert. [9-10]

Wie Gaini et al. belegen konnten, bewirken akute inflammatorische Prozesse wie etwa im Falle einer Bakteriämie oder einer schweren Sepsis eine signifikante Erhöhung des sCD163-Plasmaspiegels. Eine Sepsis stellt dabei eine überschießende Reaktion des Organismus auf bakterielle Erreger dar. [61-63] Auch bei einer akuten myelomonozytären Leukämie können signifikant erhöhte sCD163-Werte gefunden werden, welche im Zusammenhang mit einer akuten Infektion oder einer Sepsis weiter ansteigen. [47, 64] Des Weiteren wird eine positive Korrelation zwischen dem sCD163-Spiegel und der Plasmakonzentration der Zytokine IL 6 und IL 10 beschrieben. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass sCD163 während eines entzündlichen Geschehens nicht nur vermehrt gebildet wird, sondern dabei in erster Linie den antiinflammatorischen Prozess im Rahmen der Infektabwehr reflektiert. In diesem Zusammenhang kann sCD163 als potenter prognostischer Marker angesehen werden, da besonders hohe Plasmaspiegel nachweislich mit einer höheren Letalität der Patienten korrelieren. [61]

Auch bei chronischen Erkrankungen wie etwa der Rheumatoiden Arthritis, Leberzirrhose, Spondyloarthropathie, Morbus Gaucher oder dem reaktiven haemophagozytischen Syndrom sind signifikante Erhöhungen der sCD163-Konzentrationen gemessen worden. Dieser Anstieg ist auch hier auf die erhöhte Aktivität und Proliferation von Makrophagen zurückzuführen. [16, 65-69] Die zentrale Rolle dieser Immunzellen sowohl in der Infektabwehr aber auch bei chronischen

Erkrankungen, insbesondere solchen, die mit einer gesteigerten Makrophagenaktivität einhergehen, macht sCD163 nicht nur zu einem interessanten prognostischen Marker, sondern auch zu einem möglichen Verlaufsparemeter, der die Aktivität und Schwere der Erkrankung widerspiegeln könnte. [62, 69-70]

Weitere wichtige Eigenschaften des sCD163 stellen die Inhibierung der durch PMA induzierten T-Lymphozytenproliferation sowie die Verminderung des proinflammatorischen Enzyms Matrixmetalloproteinase in aktivierten Lymphozyten dar. Diese zytokinähnlichen Funktionen des sCD163 spielen in der späten Phase der Inflammation zusammen mit anderen antiinflammatorischen Mediatoren eine wichtige Rolle bei der Beendigung der Abwehrreaktion. [71-72]

#### **1.4 Aufgabenstellung**

Eine erhöhte Körperfettmasse ist assoziiert mit einer chronischen Inflammation, was sich unter anderem in vermehrten systemischen Mengen proinflammatorischer Proteine wie IL 6 darstellt. In dieser Entzündungsreaktion ist pathophysiologisch der Zusammenhang zwischen einem erhöhten Körpergewicht und der Entstehung von Folgeerkrankungen wie Atherosklerose, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 zu sehen. Die aus dieser veränderten Stoffwechsellage resultierenden Effekte auf CD163 konnten von Levy A.P. et al. in einer Studie aufgezeigt werden. Hierbei wiesen Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zu Monozyten von geeigneten Kontrollen eine signifikante Reduktion der CD163-Oberflächenexpression auf, während die Konzentration an sCD163 im Plasma deutlich erhöht war. [73]

Da Adiponektin im Serum von Patienten mit Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 oder koronarer Herzerkrankung in deutlich verminderter Konzentration vorliegt und die Funktion von Monozyten beeinflusst, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Adiponektin CD163 verändert. Dies sollte sowohl durch in vitro-Inkubationen primärer Monozyten von gesunden Kontrollen mit Adiponektin als auch durch die Analyse von Monozyten, isoliert von normalgewichtigen Spendern, Probanden mit Übergewicht und mit Diabetes mellitus Typ 2, überprüft werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob es eine Korrelation von zirkulierendem Adiponektin mit systemischem CD163 gibt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer (12 x 14 cm) und Zubehör	Peqlab
Analysenwaage BP 221 S	Sartorius
Analysenwaage PT-1200	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
Drucker für Geldokumentation DGP UP-D890	Sony
Eismaschine ZBE 150	Ziegra
ELISA-Reader	Molecular Devices
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Erdgasbrenner	Bochem
FACS Calibur	Becton Dickinson (BD)
Geldokumentation	MWG-Biotech
Inkubationsschrank 37°, 5% CO <sub>2</sub>	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank mit Umlaufschüttler S150	Stuart
LightCycler® Real-Time RT-PCR mit Zubehör	Roche
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
MidiMACS™ Separator quadro	Miltenyi Biotec
Mikroskop und Zubehör	Nikon
Milli-Q Biocell	Millipore
PCR Cycler T-Gradient Thermocycler	Biometra
pH-Meter 764 Multi-Calimatic	Knick
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply E445	Consort
Power Supply E835	Consort
Power Supply Power Pac 200	BIORAD
Schüttler 3013	GFL
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik
Schüttler IKA-Vibrax-VRX	Janke und Kunkel
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	BIORAD

---

SDS-Gelplatten und Zubehör	BIORAD
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Sterilisator WTC	Binder
Thermoblock TB 1	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Ultraschallgerät mit Power Supply	Bandelin
UV/Vis Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia
UV-Flächenstrahler TFX-20 M	MWG-Biotech
Vakuumpumpe	KNF Laboport
Vortex VF2	Janke und Kunkel
Vortex Typ 54117 Reax 1 D R	Heidolph
X-Ray Filmkassette (18 x 24 cm)	Siemens
Zellzählkammer, Tiefe 0,1 mm	Neubauer
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
Zentrifuge RC 5C Plus	Sorvall
Zentrifugenrotor SS34,SLA-1500	Sorvall

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette (5 ml)	BD Falcon®
Dialyseschlauch (29 mm)	Serva
ELISA-Platte (96 Loch)	Corning Costar®
Gel Blotting Papier Whatman®	Schleicher & Schuell
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)	BIORAD
Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon®
LightCycler® Kapillaren (20 µl)	Roche
MACS CD14 Micro Beads	Miltenyi Biotec
MACS LS magnetische Separationssäulen	Miltenyi Biotec
Parafilm	American National Can™
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Safety-Multifly- Set	Sarstedt
Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt
S- Monovette 4 ml (1,6 mg EDTA / ml Blut)	Sarstedt
Steriflip® (50 ml, 0,22 µm Porengröße)	Millipore

---

Sterile Einmalspritzen	BD Falcon®
Sterile Filter-Spitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym Diagnostik
Sterile Kanülen	BD Microlance™
Sterile Membran-Adapter	Sarstedt
Vacutainer®CPT™ (8 ml)	Becton Dickinson (BD)
Vacutainer Systems Safety-Lok™ Blood Collection Set	Becton Dickinson (BD)
Vacutainer Systems PrecisionGlide™ (0,8 bzw. 0,9 x 38 mm)	Becton Dickinson (BD)
Vakuum Sterilfiltrationssystem (500 ml, 1000 ml)	Millipore
Zell Schaber (16 cm, 25 cm)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6-Loch) Flat Bottom Cell+	Sarstedt

### 2.1.3 Chemikalien

Acrylamidlösung (40%)	BIORAD
Adiponektin	R&D Systems
AICA – Ribosid	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS) (10%)	BIORAD
Bicinchoninsäure	Sigma
Bisacrylamidlösung (2%)	BIORAD
Bromphenolblau	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol
CaCl <sub>2</sub>	Fluka
Chloroform	Merck
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Desoxycholate	Sigma
Desoxynukleosid-Triphosphat-Set	Roche
DNA-Leiter, 1 kb	Invitrogen
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
EDTA	Merck
FCS	Biochrom
Full Range Rainbow™ Proteinstandard	Amersham Biosciences
Glycerin	Merck
Glyzin	Merck
Igepal	Sigma
In Solution Compound C	Calbiochem
Kupfer(II)sulfat	Sigma
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma

---

Magermilchpulver	Vitalia
β-Mercaptoethanol	Sigma
Metformin	Calbiochem
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
Natriumazid	Fluka
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Nukleasefreies Wasser	Promega
Ölsäure	Sigma
Palmitinsäure	Sigma
PBS	Gibco
2-Propanol	Merck
p38 MAPK Inhibitor SB 203580	Calbiochem – Merk
RPMI 1640	PAN
Salzsäure rauchend	Merck
Schwefelsäure rauchend	Merck
SDS	Merck
Softasept® N	Braun
TEMED	Merck
Thromborel® S	Dade Behring
Tris-NH <sub>3</sub>	Merck
Tris-HCl	Merck
Trizol	Invitrogen
Tween® 20	Sigma
Xylencyanol	Merck

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Primäre Antikörper

Anti- Human CD163 monoklonaler Antikörper	Morphosys AbD
Anti- GAPDH monoklonaler Antikörper	New England Biolabs GmbH

### 2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research
Anti-Maus Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research

### 2.1.5 Kit-Systeme

DuoSet® ELISA Development System human Adiponectin	R&D Systems
CD163 Enzyme Immunoassay	Dianova
DuoSet® ELISA Development System human IL-6	R&D Systems
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Bioscience
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Reverse Transcription System	Promega
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Streptavidin-HRP	R&D Systems
Substrate Reagent Pack	R&D Systems

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Im Folgenden wird die Zusammensetzung aller selbst hergestellten Puffer und Lösungen aufgeführt. Die Lagerung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

#### 2.1.6.1 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

##### 2.1.6.1.1 Lösungen für die Herstellung von Proteinextrakten

##### RIPA-Lysepuffer:

NaCl, 3 M Stammlösung	2,5	ml
Igepal	500	µl
Desoxycholate	0,25	g
SDS, 20%ige Stammlösung	250	µl
Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5	2,5	ml
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

Vor Gebrauch wurde pro 10 ml RIPA-Puffer eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Der Puffer wurde bei 4°C höchstens zwei Wochen gelagert.



### 2.1.6.1.2 Lösungen für SDS-PAGE

#### SDS-Probenpuffer (2 x Lämmli), 2-fach:

Glyzerin (87 %)	2	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	120	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH <sub>2</sub> O

Der SDS-Probenpuffer wurde im Verhältnis 1:1 mit der jeweiligen Probe vermischt.

#### SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

Glyzin	144	g
Tris-NH <sub>3</sub>	30	g
SDS, 20%ige Stammlösung	50	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

#### Lösung für 15%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	30,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	10,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,4	ml
ddH <sub>2</sub> O	32,0	ml

#### Lösung für 10%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	15,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	7,5	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,3	ml
ddH <sub>2</sub> O	28,5	ml

#### Lösung für 5%ige Sammelgele:

Acrylamid 40%	5,0	ml
Bisacrylamid 2%	2,6	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 6,8	5,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,2	ml
ddH <sub>2</sub> O	24,0	ml

Die Acrylamidlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Gießen des Trenn- bzw. Sammelgels wurde der Acrylamidlösung 10%ige APS-Lösung im Verhältnis 1:167 und TEMED im Verhältnis 1:334 zugegeben.

### 2.1.6.1.3 Lösungen für Western-Blot

#### Tank-Puffer, 10-fach:

Glyzin	140	g
Tris-NH <sub>3</sub>	30	g
SDS	5	g
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

#### Wettransfer-Puffer:

Methanol (technisch)	200	ml
Tank-Puffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

#### PBST:

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l PBS

#### Blockierlösung:

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml PBST

Die Blockierlösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

#### BSA-PBST:

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l PBS

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Die primären Antikörper wurden in dieser Lösung im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

### 2.1.6.1.4 Lösungen für CD163-ELISA

#### Standard:

Gebrauchsfertig		
Standard 1	300	ng/ml
Standard 2	60	ng/ml
Standard 3	12	ng/ml

#### Waschpuffer:

Verdünnung	125	ml
	ad 875	ml ddH <sub>2</sub> O

#### Assay Buffer:

Gebrauchsfertig

#### Substratpuffer:

Gebrauchsfertig

**Detektions – Antikörper:**

Anti- Huhn polyklonaler Antikörper zur Detektion von CD163.  
Gebrauchsfertig.

**Peroxidase – Konjugat:**

Peroxidase konjugierter polyklonaler Antikörper.

Verdünnung	0,1	ml
	ad 10	ml Assay Buffer

**TMB – Arbeitslösung:**

Tetramethylbenzidine (TMB) – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Verdünnung	1,0	ml
	ad 20	ml Substratpuffer

Die Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

**Stopplösung:**

Schwefelsäure rauchend	9,8	g
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

**2.1.6.1.5 Lösungen für IL 6-ELISA****Waschpuffer:**

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l PBS

**Reagent Diluent:**

BSA	5	g
	ad 0,5	l PBS

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

**Substratlösung:**

Die Lösungen A und B (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) des Substrate Reagent Pack von R&D Systems wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt.

**Stopplösung:**

Schwefelsäure rauchend	9,8	g
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

**Verdünnung der Antikörper:**

Die Capture AK wurden laut Protokoll in PBS, die Detection AK in Reagent Diluent verdünnt.

**Verdünnung des HRP-Streptavidin-Konjugats:**

Das HRP-Streptavidin-Konjugat wurde laut Packungsangabe in Reagent Diluent verdünnt.

**2.1.6.2 Lösungen für die Isolierung primärer humaner Monozyten****CD14 Beads Puffer:**

BSA	0,5	g
EDTA, 0,5 M Stammlösung pH 8,0	2,0	ml
	ad 0,5	l PBS

Der CD14 Beads Puffer wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

**2.1.6.3 Lösungen für Durchflusszytometrie****Erythrozyten – Lysepuffer:****Färbungen:**

Peroxidase konjugierter monoklonaler Maus IgG1κ- Antikörper	BD Pharmingen
Peroxidase konjugierter monoklonaler Maus IgG2a κ- Antikörper, Klon: eBM2a (Isotyp – Kontrolle)	eBiosence
Peroxidase konjugierter CD3- Antikörper, Klon: OKT3	eBiosence
FITC Maus CD14- Antikörper	BD Pharmingen
Peroxidase konjugierter Maus CD163- Antikörper	BD Pharmingen
Peroxidase konjugierter Maus CD137- Antikörper	BD Pharmingen

**2.1.7 Primer für LightCycler-Analysen**

Die Primer für die LightCycler-Expressionsanalysen wurden jeweils zu beiden Seiten eines Introns gewählt, um die Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden. Eine Länge der amplifizierten Fragmente von etwa 300 bp garantierte möglichst kurze Elongationszeiten. Außerdem wurden die Primer so entworfen, dass die Annealing-Temperatur etwa 60°C betrug. Die Spezifität der Primer wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte verifiziert.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	PCR-Produkt (bp)
β-Actin		
β-Actin_uni	CCAGGGTGTGATGGTGGGAATG	370
β-Actin_rev	CGCACGATTTCCCTCTCAGCTC	
CD163		
CD163_uni	CCATAGTGAGTGTGGGCACAA	407
CD163_rev	TCAGTGTGGCTCAGAATGGCCTC	

### 2.1.8 Rekombinantes Adiponektin

Zur Stimulation der primären Monozyten wurde zum einen hochmolekulares Adiponektin der Firma R&D Systems und zum anderen in der Arbeitsgruppe mit Hilfe von Insektenzellen hergestelltes, trimeres Adiponektin verwendet. Zur Herstellung des niedermolekularen, trimeren Adiponektins wurde die cDNA von Adiponektin mit Hilfe von Baculoviren in H5-Insektenzellen eingeschleust, von diesen exprimiert und anschließend aus den Überständen gereinigt. [40]

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Erstellen einer EDTA-Plasma-Bank männlicher Typ 2 Diabetiker und geeigneter Kontrollen

Das Studienprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission geprüft und stimmt mit den Vorgaben der Deklaration von Helsinki (1997) überein. Jeder Proband wurde über das Projekt aufgeklärt und unterschrieb eine Einverständniserklärung.

Erstellt wurden drei Kollektive, die sich folgendermaßen zusammensetzen: Typ 2 Diabetiker, Kontrollen mit einer *Waist-to-hip-ratio* (WHR) unter 0,98 (CG2) und Kontrollen mit einer WHR über 0,98 (CG1). Im Folgenden wird das Kollektiv der Probanden mit einer WHR < 0,98 als normalgewichtige Kontrollgruppe und das der Probanden mit einer WHR > 0,98 als übergewichtige Kontrollgruppe bezeichnet.

Es wurden primäre Monozyten aus dem Blut von elf männlichen Probanden mit Diabetes mellitus Typ 2, von elf männlichen, übergewichtigen und elf männlichen, normalgewichtigen Kontrollen isoliert.

Das Durchschnittsalter der Typ 2 Diabetiker liegt bei 62 Jahren mit einer Verteilung von 42 bis 76 Jahren. Das mittlere Alter der normalgewichtigen Kontrollen beträgt 54 Jahre mit einer Verteilung von 44 bis 67 Jahren. Die übergewichtigen Kontrollen

haben ein mittleres Alter von 56 Jahren mit einer Verteilung von 40 bis 63 Jahren. Weitere Details dieser Studiengruppe sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Des Weiteren wurde Serum von 43 männlichen Typ 2 Diabetikern, von 32 männlichen, übergewichtigen Kontrollen und 31 männlichen, normalgewichtigen Kontrollen gesammelt.

Das Durchschnittsalter der Typ 2 Diabetiker liegt bei 66 Jahren mit einer Verteilung von 42 bis 88 Jahren. Das mittlere Alter der normalgewichtigen Kontrollen beträgt 56 Jahre mit einer Verteilung von 41 bis 73 Jahren. Die übergewichtigen Kontrollen haben ein mittleres Alter von 60 Jahren mit einer Verteilung von 40 bis 79 Jahren. Weitere Details dieser Studiengruppe sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Diesen insgesamt 106 Probanden wurden jeweils 4 ml EDTA-Plasma mit S-Monovetten der Firma Sarstedt abgenommen. Anschließend wurde das Plasma in der Zentrifuge bei 3900 rpm für zehn Minuten bei RT zentrifugiert. Der vom Blutkuchen abgenommene Plasmaüberstand wurde aliquotiert und getrennt vom Blutkuchen bei -20°C zur weiteren Verwendung eingefroren.

### **2.2.2 Isolierung humaner peripherer Monozyten aus Vollblut**

Ein bereits in der Arbeitsgruppe angelegtes Kollektiv von Monozyten, isoliert aus dem Vollblut von Typ 2 Diabetikern, normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen, wurde erweitert. Zur Gewinnung der Monozyten wurden den Probanden jeweils circa 50 ml Vollblut mit Hilfe von Vacutainern abgenommen.

Die mit jeweils 8 ml Vollblut gefüllten Vacutainer wurden direkt nach der Blutentnahme mehrmals invertiert, um das Natriumcitrat im Röhrchen mit dem Blut zu vermischen und eine Gerinnung zu verhindern. Anschließend wurden die Vacutainer bei 2900 rpm für 25 min bei RT zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt und das Polyestergel in den Vacutainern wurden die Blutbestandteile gemäß ihrer Dichte separiert: Schwere Bestandteile, v. a. aber Erythrozyten, wurden am Boden des Röhrchens zurückgehalten, während leichtere Bestandteile, wie etwa das Plasma und mononukleäre Zellen sich nun über der Gelschicht befanden. Die Vacutainer wurden anschließend abermals 5-6-mal invertiert und unter der Sterilbank geöffnet. Plasma und mononukleäre Zellen eines Spenders wurden abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde anschließend bei 1200 rpm für 15 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 20 ml

PBS gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 10 min, RT). Das Plasma wurde jeweils auf vier Eppendorfcups zu je 1 ml aufgeteilt; der Rest wurde in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Schließlich wurde das gesamte Plasma bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde in 2 ml CD14-Beadspuffer resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und einem weiteren Zentrifugationsschritt unterzogen (1200 rpm, 10 min, RT). Anschließend wurde das Pellet in CD14-Beadspuffer (160 µl pro 6 Vacutainer) resuspendiert und mit CD14-Beads (40 µl pro 6 Vacutainer) für 20 min bei 4°C inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurde das Eppendorfcup alle 5 min angeschnippt, um eine gute Durchmischung von Beads und Zellen zu gewährleisten. Dabei konnten sich die an die magnetischen Beads gekoppelten monoklonalen CD14-Antikörper an das Oberflächenprotein CD14, das v.a. von Monozyten exprimiert wird, anlagern.

Die so markierten Monozyten konnten nun durch ein magnetisches Feld von anderen Zellen separiert werden. Hierzu wurde der Zellsuspension nach der Inkubation 1 ml CD14 Beadspuffer zugegeben und bei 1200 rpm erneut 10 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich in 2 ml CD14-Beadspuffer aufgenommen. In einen Magneten wurden LS Säulen eingespannt, die mit jeweils 3 ml CD14 Beadspuffer äquilibriert wurden. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension auf eine Säule gegeben und dreimal mit je 3 ml CD14 Beadspuffer gewaschen. Danach wurden die Monozyten eluiert: Hierzu wurden die Säulen nacheinander vom Magneten abgenommen und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen gestellt. Die Elution der Monozyten erfolgte mit 5 ml CD14 Beadspuffer. Schließlich wurden die monozytären Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT) und der Überstand verworfen.

Ein 10 µl Aliquot wurde verwendet, um die Zellzahl in der Neubauer Zellzählkammer zu ermitteln. Die Ausbeute lag bei ca. 1 - 1,5 Millionen Monozyten pro Vacutainer. Die Zellen wurden in RPMI Medium mit 10 % autologem Serum (3 Mio/Loch) in 6-Loch Platten kultiviert.

Zur RNA-Isolierung wurden die Monozyten in 300 µl Trizol aufgenommen und schließlich bei -80°C gelagert; für das Arbeiten mit Proteinen wurde das Zellpellet in 50 µl RIPA resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.3 Herstellen von autologem Serum**

Für die Durchführung von in vitro Experimenten mit Monozyten wurde autologes Serum benötigt das aus Plasma hergestellt wurde. Das Plasma wurde während der Monozyten-Isolation gewonnen (s. oben).

Vorab wurde PBS auf 4°C gekühlt. Außerdem wurde Thromborel in 10 ml Wasser gelöst und für mindestens 30 Minuten bei 37°C gelagert.

Zum Plasma in dem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden schließlich sowohl eine Spatelspitze Calciumchlorid, als auch das gelöste Thromborel (1%) gegeben. Es folgte eine Inkubation des Plasmas für 10 min bei 37°C. Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette das Gerinnungsprodukt von der Innenwand des Zentrifugenröhrchens gelöst und für 30 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Dialyseschlauch überführt und eine Stunde gegen das gekühlte PBS dialysiert; nach PBS-Wechsel erfolgte eine weitere Dialyse über eine Stunde. Abschließend wurde das so gewonnene Serum steril filtriert.

### **2.2.4 Arbeiten mit cDNA/RNA**

#### **2.2.4.1 Isolierung von RNA**

Die Isolierung von RNA aus Monozyten erfolgte nach der Trizol-Methode: Die Monozyten in 300 µl Trizol wurden aufgetaut, mit jeweils 1/5 Volumen Chloroform versetzt (60 µl) und das Gefäß 4- bis 5-mal invertiert. Nach einer Inkubation über 2 min bei RT wurde der Ansatz für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Die so entstandene klare obere Schicht wurde abgezogen, in ein anderes Eppendorfcup überführt und wiederum mit 1/5 Volumen Chloroform versetzt. Nach Wiederholung aller bisherigen Schritte wurde zu der klaren Lösung Isopropanol (0,7 Vol.) gegeben, das zum Ausfällen der RNA führt, und mehrmals invertiert. Es folgte eine Inkubation über 10 min auf Eis und eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 12000 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit vorgekühltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation über 15 min bei 12000 g wurde das Ethanol vorsichtig abgenommen und das Pellet getrocknet. Die so gewonnene RNA wurde in 40 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.



### 2.2.4.2 Real-Time PCR

Mit Hilfe der Real-Time PCR können Nukleinsäuren schnell und sensitiv quantifiziert werden. Durch die Kombination aus Thermocycler und Fluorimeter kann die Amplifikation von PCR-Produkten schnell analysiert und während des gesamten Reaktionsverlaufs verfolgt werden. Durch die Real-Time PCR konnte die Genexpression in primären Monozyten bestimmt werden. Dazu wurde die RNA der Zellen in einzelsträngige cDNA überführt, welche für die Real-Time PCR eingesetzt werden konnte. Zur Detektion wurde in allen Experimenten auf den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I zurückgegriffen; es wurde der LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) verwendet. Zuerst wurde ein Master-Mix hergestellt, der bereits alle nötigen Reagenzien enthielt und dem nur noch die cDNA zugesetzt werden musste. Ein Master-Mix für eine Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsmix (Roche)	2,0	µl
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	2,4	µl
universe Primer, 5 pmol/µl	1,0	µl
reverse Primer, 5 pmol/µl	1,0	µl
ddH <sub>2</sub> O	11,6	µl

Der Master-Mix wurde nun zu je 18 µl auf dünne Glaskapillaren aufgeteilt. SYBR Green I, Reaktionspuffer, dNTPs und HotStart Taq-Polymerase waren im Reaktionsmix (Roche) bereits enthalten. Nach der Zugabe von 2 µl der jeweiligen cDNA bzw. 2 µl Wasser für die Wasserkontrolle wurden die Kapillaren kurz bei 2000 rpm zentrifugiert, so dass die Reaktion in der Tiefe der Glaskapillaren ablaufen konnte. Anschließend wurden die Proben im LightCycler für zehn min auf 95°C erhitzt. Dabei wurde die Taq-Polymerase aktiviert, die die Amplifizierung der jeweiligen genspezifischen DNA einleitete. Es wurden insgesamt 40 bis 45 Amplifizierungszyklen durchgeführt, wobei sich jeder Zyklus aus 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 10 s Annealingphase bei etwa 60°C (spezifisch für die jeweiligen Primer) und 10 s Elongationsphase bei 72°C zusammensetzte.

Nach Abschluss der Elongationsphase wurde in jedem Amplifikationszyklus die Konzentration an DNA bestimmt. Dies geschah durch die Bestimmung der Fluoreszenz bei einer für das PCR-Produkt geeigneten Temperatur (75-85°C). Da sich das SYBR Green I in doppelsträngige DNA einlagert, verhält sich die

gemessene Fluoreszenz proportional zum Reaktionsprodukt der amplifizierten DNA (Abbildung 5).

Für jede Probe wurde ein spezifischer Crossing Point (Cp) bestimmt, indem in einem Graphen die Fluoreszenzmesswerte gegen die Zyklenzahl aufgetragen wurden. Der Cp beschreibt den Reaktionszyklus, in dem die gemessene Fluoreszenz einen deutlich positiven Wert annimmt. Außerdem ist der Cp umgekehrt proportional zur Ausgangskonzentration der cDNA. Verschiedene Proben benötigen demnach in Abhängigkeit ihrer Ausgangskonzentration eine unterschiedliche Anzahl an Amplifikationszyklen, um den Cp zu erreichen.

Damit nun verschiedene PCR-Reaktionen unterschiedlicher Effizienz miteinander verglichen werden konnten, bediente man sich einer Standardkurve: Hierzu wurde jeweils eine 1:1-Verdünnungsreihe der betreffenden cDNA hergestellt (Monozyten-cDNA) und jedem der vier Standardproben ein definierter Wert zugewiesen (50, 25, 12,5 und 6,25 ng). Durch die Auftragung der Cp-Werte der Standardproben gegen den Logarithmus der jeweiligen Konzentration entstand eine Standardkurve, die jedem Cp eine definierte Konzentration zuordnete.

Um eine Aussage über die Regulation eines bestimmten Zielgens treffen zu können, wurde zusätzlich von jeder Probe die cDNA-Konzentration eines sog. Housekeeping-Gens (hier  $\beta$ -Actin) bestimmt, das durch die jeweilige Stimulation nicht reguliert wurde. Der Quotient aus den cDNA-Konzentrationen des Zielgens und des  $\beta$ -Actins ergibt einen zum Housekeeping-Gen normalisierten Wert, der hinsichtlich Qualitäts- und Quantitätsunterschiede in der Probenvorbereitung korrigiert ist.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde nach der Amplifikationsphase durch eine Schmelzkurve überprüft: Dazu wurde die cDNA langsam ( $0,1^\circ\text{C/s}$ ) von  $60^\circ\text{C}$  auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und analog die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Da jede spezifische Reaktion auch nur ein spezifisches Produkt bildet, das bei einer bestimmten Temperatur schmilzt, nimmt am Schmelzpunkt die Fluoreszenz plötzlich stark ab. Entstehen jedoch durch unspezifische Reaktionen mehrere Produkte, so kommt es zu einer unscharfen Abnahme der Fluoreszenz, unter Umständen über mehrere Stufen. Eine schematische Darstellung des PCR-Zyklus bei Verwendung von SYBR Green zeigt Abbildung 5.

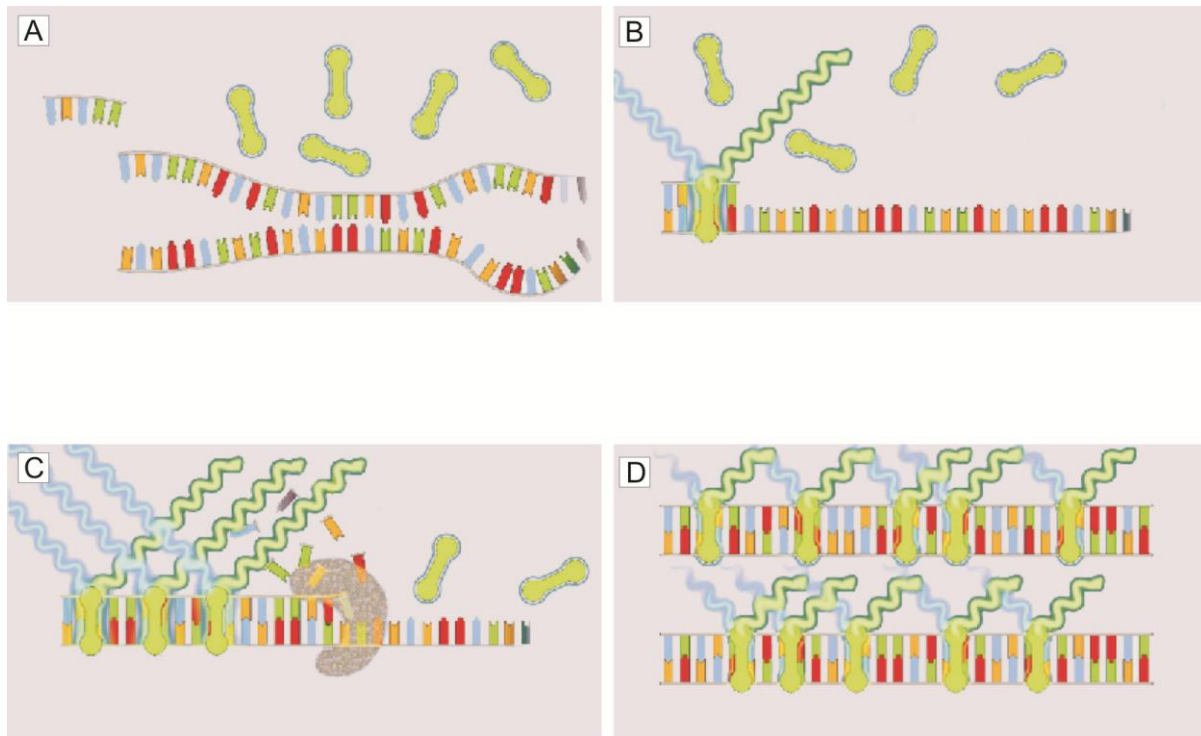


Abb. 5: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus bei Verwendung von SYBR Green I  
(A) Denaturierung, (B) Annealing, (C) Elongation, (D) PCR-Produkt

## 2.2.5 Proteinchemische Methoden

### 2.2.5.1 Präparation von Gesamtproteinextrakten

Die Präparation von Gesamtproteinextrakten aus Säugerzellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Zuerst wurde der Zellüberstand abgenommen. Anschließend folgte ein Waschschrift der am Boden adhärenen Monozyten mit PBS. Die primären Monozyten wurden daraufhin mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturplatten gelöst und mit PBS, das mit einem Proteaseinhibitor versetzt war, gewaschen. Das Zellpellet wurde in 40 µl eiskaltem RIPA-Zelllysepuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und die genomische DNA im Zelllysate mit Ultraschall geschert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA)- Methode. Dazu wurden die Proben 1:10 in PBS verdünnt. Hiervon wurden wiederum 10 µl mit 200 µl der Reaktionslösung versetzt. Letztere bestand aus einem Gemisch von Bicinchoninsäure und 4%iger Kupfer-II-Sulfatlösung im Verhältnis 1:50. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Proteine bilden dabei über ihr Rückgrat mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen einen Komplex, wobei die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert werden. Diese  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex aus, der photometrisch gemessen werden kann. Die Bildung dieses Farbkomplexes steigt linear mit der vorhandenen Proteinmenge an. Um die Menge an Protein in der Probe quantifizieren zu können, wird jeweils parallel eine Standardkurve mit BSA erzeugt, aus welcher sich die Konzentrationen der unbekannten Proben berechnen lassen.

### **2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

In der SDS-PAGE werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteine werden dazu mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht. Dadurch denaturieren die Proteine und interagieren mit SDS, wobei das SDS durch seine aliphatischen Seitenketten die Proteine partiell auffaltet. Der Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol zum SDS-Probenpuffer sorgt dafür, dass alle Disulfidbrücken in einem Peptid gespalten werden. In dieser Arbeit wurden 10%ige und 15%ige Trenngele verwendet. Zum Gießen der Gele wurden 5 ml der Trenngellösung und 2,5 ml der Sammelgellösung (2.1.6.1.2) jeweils mit entsprechenden Mengen an APS und TEMED versetzt, die die radikalische Polymerisierungsreaktion auslösen. In das noch flüssige Sammelgel wurde zur Ausbildung der Taschen ein Kamm mit 10 oder 15 Zähnen gesetzt.

Nach der Polymerisation wurden die Gele in die Elektrophoreseapparatur gespannt und unter 1 x SDS-Gellaufpuffer gesetzt. Anschließend wurden die aufgekochten Proben in die Taschen pipettiert. Zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine wurde der Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker in die letzte Tasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel.

#### 2.2.5.4 Western-Blot

Unter Western-Blot versteht man den Transfer von Proteinen, die durch eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Membran mit anschließendem immunologischen Nachweis. In dieser Arbeit wurde ein Wetttransfer-Verfahren angewendet, bei dem die Proteine mittels Elektrobplot auf die Membran transferiert wurden. Die Proteine werden auf eine Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm) (BIORAD) übertragen, die vor Gebrauch kurz in Methanol und danach in Wetttransferpuffer äquilibriert wird. Die jeweils verwendeten Netze, Whatman-Filterpapiere und das Gel wurden ebenfalls mit Wetttransferpuffer äquilibriert. Aus den Filterpapieren, der Membran und dem Gel wird ein „Blot-Sandwich“ aufgebaut und in die Blotapparatur eingespannt. Bei einer Spannung von 80 V findet der Transfer der Proteine auf die Membran statt, währenddessen der Transferpuffer unter Kühlung mit einem Magnetrührer ständig gemischt wird.

Um für die anschließende Detektion der Proteine mittels Antikörper unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran für 1 h in Blockierlösung (2.1.6.1.3) geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in Antikörperlösung. Die Inkubation fand meist über Nacht bei 4°C oder mindestens für 2 h bei RT statt. Die Membran wurde im Anschluss gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, in 10 ml Blockierlösung. Der sekundäre Antikörper wurde 1:5000 verdünnt, für 1 h inkubiert und die Membran daraufhin wieder gewaschen. Zur Detektion der HRP wurde ECL Plus Western-Blot Detection Reagent Lösung verwendet. Die beiden Reagenzien der ECL-Lösung wurden laut Herstellerangaben gemischt und 1 ml sofort auf die Membran gegeben. Nach 5 min wurde überschüssiges Reagenz entfernt und die Membran in einer Klarsichtfolie in die lichtdichte Filmkassette gelegt. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgte mit Hyperfilm ECL™ abhängig von der Intensität des Signals über einen Zeitraum von 1 min bis zu 60 min. Abbildung 6 zeigt das Prinzip der Proteindetektion auf einer geblotteten Membran mit Hilfe eines ELISAs.

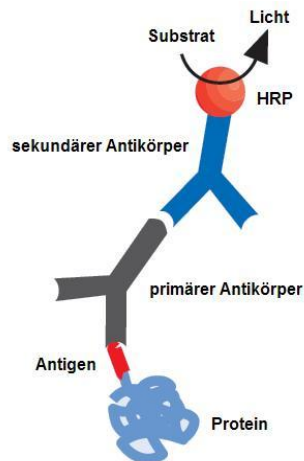


Abb. 6: ELISA in schematischer Darstellung (verändert aus Qiagen-a-HIS-Detection Protokoll)

#### 2.2.5.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) können gelöste Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Das Prinzip des ELISAs beruht, analog zum Western Blot, auf einer Antikörper-gekoppelten Farbreaktion. Das Protein wird zunächst über einen am Plattenboden gebundenen Antikörper (Capture AK) immobilisiert und anschließend mit einem zweiten Antikörper (Detection AK) detektiert. Der zweite Antikörper wird über eine spezifische Interaktion an ein Enzym gekoppelt, das ein farbloses Chromogen in ein farbiges umsetzt. Der Farbstoff wird proportional zur Menge des gebundenen Proteins gebildet und kann photometrisch erfasst werden. Über eine Standardkurve lässt sich somit die Proteinkonzentration der Proben berechnen. Diese Art des ELISAs wird als „Sandwich-ELISA“ bezeichnet. Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs zeigt Abbildung 7.

Auf die in dieser Arbeit verwendeten ELISAs wird im Folgenden näher eingegangen.

##### 2.2.5.5.1 DuoSet® ELISA Development System human IL 6

Der Capture AK wurde laut Protokoll in PBS verdünnt, auf einer 96-Loch-Platte zu je 100 µl pro Well verteilt und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte mit jeweils 300 µl Waschpuffer dreimal gewaschen, bevor sie mit Reagent Diluent für eine Stunde blockiert wurde. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Nun konnten sowohl der Standard als auch die Proben pipettiert werden. Der Standard wurde laut Hersteller in Reagent Diluent verdünnt. Die Proben

wurden je nach der zu erwartenden Menge des zu bestimmenden Proteins ebenfalls in Reagent Diluent, der auch als Leerwert diente, verdünnt. Es folgte eine weitere Inkubation mit den Proben für 2 h bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Platte 2 h mit dem biotinylierten Detection AK inkubiert und wiederum 3-mal gewaschen. Es folgte eine 20-minütige Inkubation mit HRP-Streptavidin, das über das Streptavidin spezifisch an das Biotin des sekundären Antikörpers bindet. Nach einem letzten Waschschrift wurde die Platte mit einer Substratlösung aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin inkubiert, in der die HRP die Bildung eines blauen Farbstoffs unterstützt. Nach 20 min wurde die Reaktion durch die Zugabe einer Stopplösung beendet, wodurch die Farbe von blau nach gelb umschlug. Die Intensität dieser Gelbfärbung wurde im Anschluss mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

#### **2.2.5.5.2 CD163 Enzyme Immunoassay**

Abweichend von der DuoSet® Reihe (R&D Systems) lagen beim CD163 – ELISA (Dianova) die Mikrotiterplatten bereits mit Capture AK gecoatet vor. Die Beladung erfolgte zu 100 µl Probe je Well, wobei der Standard bereits gebrauchsfertig im Kit enthalten war. Der Überstand primärer Monozyten wurde dabei unverdünnt, Serum hingegen in einer 1:15-fachen Verdünnung in Assay Buffer aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei RT. Am nächsten Morgen wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen und daraufhin mit 200 µl Detection Antikörper für eine Stunde bei 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften erfolgten die Zugabe von 200 µl in Assay Buffer verdünntem Peroxidase-Konjugat sowie eine erneute Inkubation bei 37°C und feuchter Atmosphäre für eine Stunde. Daraufhin wurde die Platte wiederum dreimal gewaschen und schließlich mit 200 µl TMB – Arbeitslösung für exakt 10 Minuten inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion mit 100 µl Schwefelsäure abgestoppt und die Proteinkonzentration mit dem ELISA – Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm vermessen.

Da die primären Monozyten in 10% autologem Serum kultiviert wurden, wurde zur Berechnung des löslichen CD163 in den Überständen der mit dem Serum hinzugefügte Anteil subtrahiert.

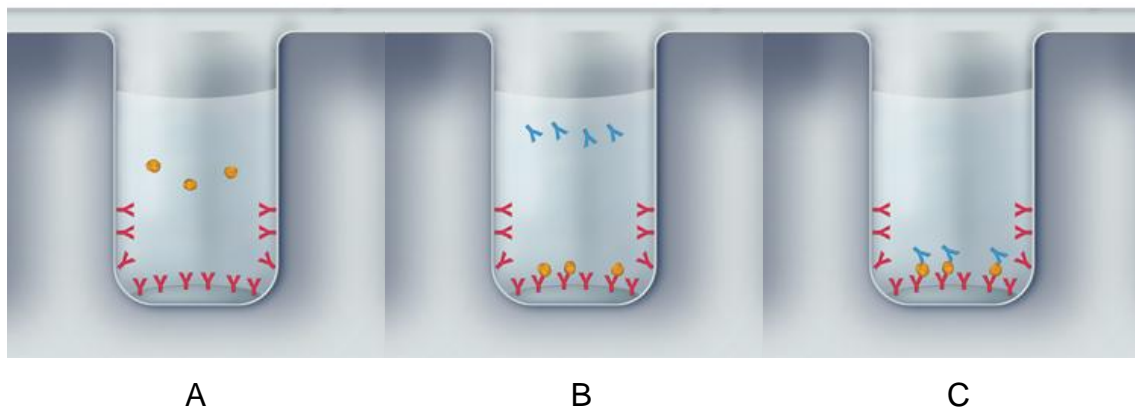


Abb. 7: Schematische Darstellung des Prinzips eines Sandwich-ELISAs (verändert nach [www.rndsystems.com/DAM\\_public/5633.jpg](http://www.rndsystems.com/DAM_public/5633.jpg)):

- A: Das zu messende Protein bindet an den Capture AK und wird dadurch immobilisiert
- B: Ein mit einem Enzym gekoppelter Detection AK bindet am Protein-AK-Komplex
- C: Durch Zugabe eines Substrates kommt es zur Farbreaktion durch das am Detection AK gekoppelte Enzym

### 2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Charakterisierung verschiedener Zellen des Immunsystems erfolgt anhand unterschiedlicher funktioneller Oberflächenmoleküle auf der Zelloberfläche. Diese Tatsache ermöglicht es mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine quantitative Analyse der Zelloberflächenmoleküle durchzuführen. Die Durchflusszytometrie oder FACS – Analyse (engl. *Fluorescence activated cell sorting*) stellt damit eines der wichtigsten Verfahren der Immunologie zur Unterscheidung von Subpopulationen verschiedener Immunzellen dar.

Die Differenzierung erfolgt dabei mit Hilfe von Antikörpern, wobei zunächst ein Primärantikörper spezifisch bestimmte Markermoleküle auf der Zelloberfläche detektiert. Im Anschluss daran wird der Primärantikörper zielgerichtet von einem sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, gebunden.

Für die weitere Analyse ist es nun wichtig, die Zellen aus dem Zellverband zu lösen und zu vereinzeln. Dies erfolgt, indem die Zellsuspension mit Druck durch eine Kapillare geleitet wird. So entsteht ein Strahl aus einzelnen feinen Tropfen, wobei jeder dieser Tropfen nur eine einzige Zelle enthält.

Der Tropfenstrahl wird dabei an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet, was eine Anregung der Elektronen des



Fluoreszenzfarbstoffs zur Folge hat. Anschließend fallen die Elektronen unter Energieabgabe wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück.

Die Lichtbeugung und -streuung geben dabei Aufschluss über verschiedene Zellparameter wie Zellzahl, Zellgröße und Granularität.

Die Vorwärtsstreuung, die Lichtstreuung entlang der Achse des einfallenden Laserstrahls, wird durch Beugung des Lichtes an der Zelloberfläche erzeugt und liefert Informationen über die Zellgröße.

Die Seitwärtsstreuung wird in einem Winkel von  $90^\circ$  zum einfallenden Lichtstrahl gemessen und ist ein Maß für die Granularität der Zellen, da sie durch unterschiedliche Bestandteile der Zellen erzeugt wird. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird ebenfalls in einem Winkel von  $90^\circ$  zum einfallenden Laserstrahl detektiert. Seine Intensität ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Sekundärantikörpers und somit proportional zur Konzentration des Oberflächenantigens auf der Zelle.

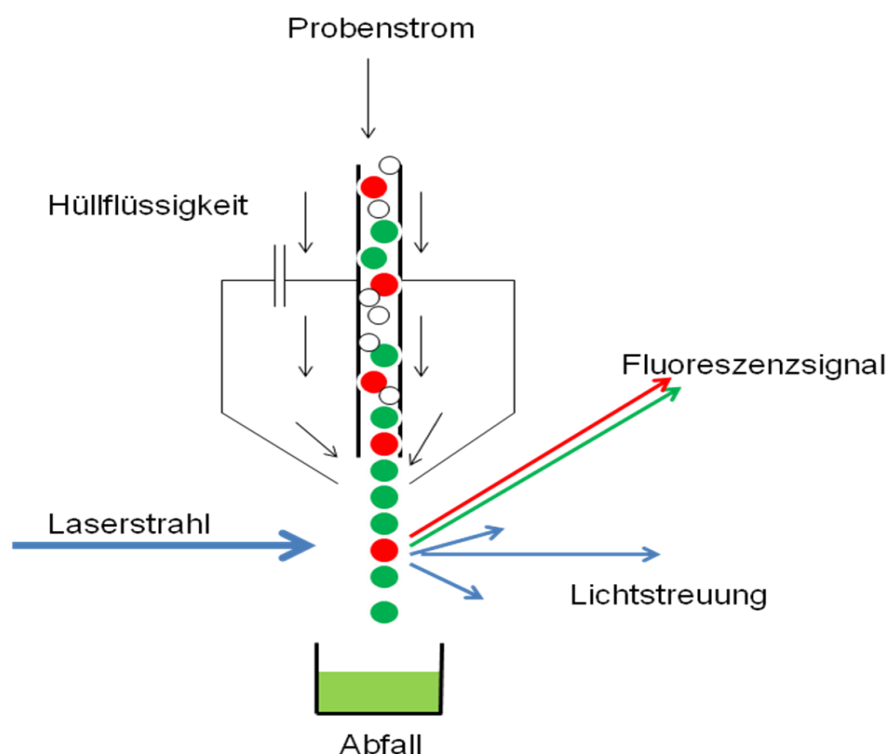


Abb. 8: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (Modell modifiziert nach Ormerod [74])

Für die in dieser Arbeit durchgeführten FACS – Analysen wurde gesunden freiwilligen Spendern mit Hilfe von S – Monovetten der Firma Sarstedt 1 ml EDTA-Plasma abgenommen. Anschließend sollte eine Aufreinigung der gewünschten Leukozytenpopulationen erfolgen, indem mit Hilfe von Lysepuffer in 20fachem Überschuss eine Erythrozytenlyse induziert wurde.

Nach 10 minütiger Inkubation wurde das EDTA-Blut dann für ca. 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, wodurch sich Zellbestandteile der Erythrozyten am Gefäßboden absetzten, während der Überstand mit den darin enthaltenen Leukozyten abpipettiert werden konnte. Anschließend erfolgte eine Wiederholung der Zugabe von Erythrozytenlysepuffer in oben angegebener Menge sowie eine weitere Zentrifugation mit dem Ziel, möglichst viele Erythrozyten aus der Zellsuspension zu entfernen, da diese für die FACS-Analyse nicht nur bedeutungslos waren, sondern diese auch unnötig verkompliziert hätten. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Zellpellet mit 5 ml CD14 Beadspuffer resuspendiert und die Zellsuspension wiederum für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Entfernen des Überstandes folgte eine weitere Wiederholung des Waschschrilles mit CD14 Beadspuffer. Schließlich wurde das Zellpellet in 1ml CD14 Beadspuffer resuspendiert und mit Hilfe der Neubauer Zellzählkammer ausgezählt.

Für das Erstellen der Färbungen wurden jeweils 1 Million Zellen in 500 µl CD14 Beadspuffer aufgenommen. Zu diesen Zellsuspensionen wurden jeweils 20 µl der jeweiligen Färbereagenzien unverdünnt zugegeben und anschließend für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation schloss sich erneut ein zweimaliger Waschschrill mit 0,5 ml CD14 Beadspuffer und nachfolgender Zentrifugation an, bevor die Zellen in 0,5 ml CD14 Beadspuffer resuspendiert im Durchflusszytometer vermessen werden konnten.

### **2.2.7 Stimulierung von primären Monozyten**

Zur Stimulierung der Zellen wurde jeweils drei Millionen Zellen pro Loch auf einer 6-Loch-Platte ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium in 10% autologem Serum. Die primären Monozyten wurden anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel und eine Stimulation mit 10 µg Adiponektin der Firma R&D Systems bzw. mit 2 µg des in der Arbeitsgruppe hergestelltem rekombinanten trimeren Adiponektins. Alternativ erfolgte eine Stimulation der primären Monozyten mit

Metformin, Palmitin- oder Ölsäure. Die freien Fettsäuren wurden dabei mit Albumin eines fettsäurefreien Kälberserums im Verhältnis 1:1 komplexiert. Gegebenenfalls wurden die Zellen zusätzlich eine Stunde vor Stimulation mit dem AMPK-Inhibitor Compound C bzw. dem p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 vorinkubiert.

Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollen. Anschließend wurden die Zellen erneut im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert. Zum Abnehmen der Zellen wurden zunächst die Überstände kurz abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und bei -20°C aufbewahrt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in PBS vom Plattenboden abgeschabt. Schließlich wurden auch diese bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Zellen, aus denen ein Proteinextrakt hergestellt werden sollte, wurden in einer entsprechenden Menge RIPA-Puffer (ca. 40 µl) aufgenommen. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.8 Statistik**

Für nicht-normalverteilte Daten wurden der Median, der niedrigste und der höchste Wert angegeben. Der Mann Whitney U-Test oder der Students T-Test wurden für die Berechnung von statistischen Unterschieden benutzt und ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant bewertet. Korrelation wurden mit Hilfe der Pearson Korrelation berechnet. Als Software diente SPSS 15.0.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Adiponektin auf das monozytäre CD163

##### 3.1.1 Einfluss von Adiponektin auf die CD163-mRNA und -Proteinexpression

Um zu klären, ob Adiponektin die CD163-Expression verändert, wurden Monozyten aus dem Blut von sieben gesunden, normalgewichtigen Spendern isoliert. Daraufhin wurden pro Spender jeweils zwei Testreihen erstellt, wovon jeweils eine mit 10 µg/ml Adiponektin für eine Dauer von 24 h in mit 10% autologem Serum versetztem Medium inkubiert wurde, während die andere Testreihe ohne Adiponektin als Kontrolle diente. Im Anschluss daran wurden die Zelllysate in Western Blot Analysen verwendet, die eine signifikante Reduktion der CD163-Proteinexpression zeigten, wie in Abbildung 9 zu erkennen ist. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH). Die Menge von CD163 wurde dabei von 51,6 (31,7 – 105,2) in den Kontrollzellen auf 41,0 (25,9 – 79,3) in den mit Adiponektin inkubierten Zellen reduziert, wie eine zusammenfassende Auswertung der sieben voneinander unabhängigen Experimente zeigte. ( $p=0,002$ )

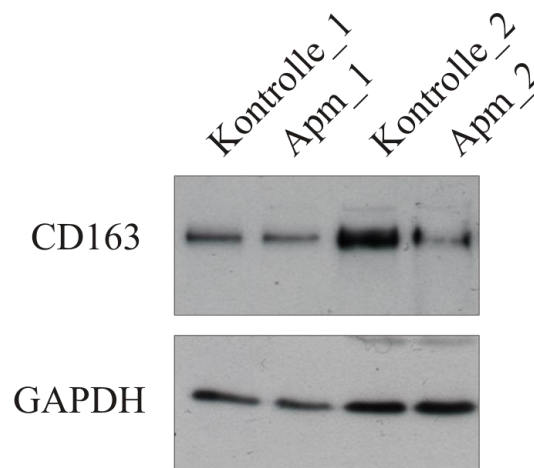


Abb. 9: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche mit bzw. ohne 10 µg/ml Adiponektin (Apm) für 24 h kultiviert wurden.

Aus den Monozyten 12 weiterer gesunder, normalgewichtiger Kontrollen wurde mRNA gewonnen, um im LightCycler die mRNA-Konzentration von CD163 zu

bestimmen. Alle Werte wurden mit  $\beta$ -Actin, dessen mRNA-Menge in den verschiedenen Proben ähnlich exprimiert war, normalisiert. Hierbei sollte untersucht werden, ob der Einfluss von Adiponektin auf CD163 in einer Regulation der mRNA begründet ist. Die Bestimmung der mRNA-Konzentration in Zellen, welche zuvor mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Adiponektin stimuliert wurden, erbrachte jedoch keine Reduktion der CD163-mRNA und damit keinen Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung von CD163 durch Adiponektin auf mRNA-Ebene. ( $p=0,184$ )

Um zu klären, ob Adiponektin auch die Oberflächenexpression von CD163 vermindert, wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine quantitative Analyse der CD163-Zelloberflächenmoleküle durchgeführt. Dazu wurden Monozyten von drei gesunden, normalgewichtigen Spendern, welche jeweils mit bzw. ohne 10  $\mu\text{g/ml}$  Adiponektin für 24 h inkubiert worden waren, durchflusszytometrisch vermessen und untereinander verglichen. Abbildung 10 zeigt eine deutliche Reduktion der CD163-Konzentration auf der Zelloberfläche von Monozyten, welche zuvor mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Adiponektin für 24 h inkubiert worden waren.

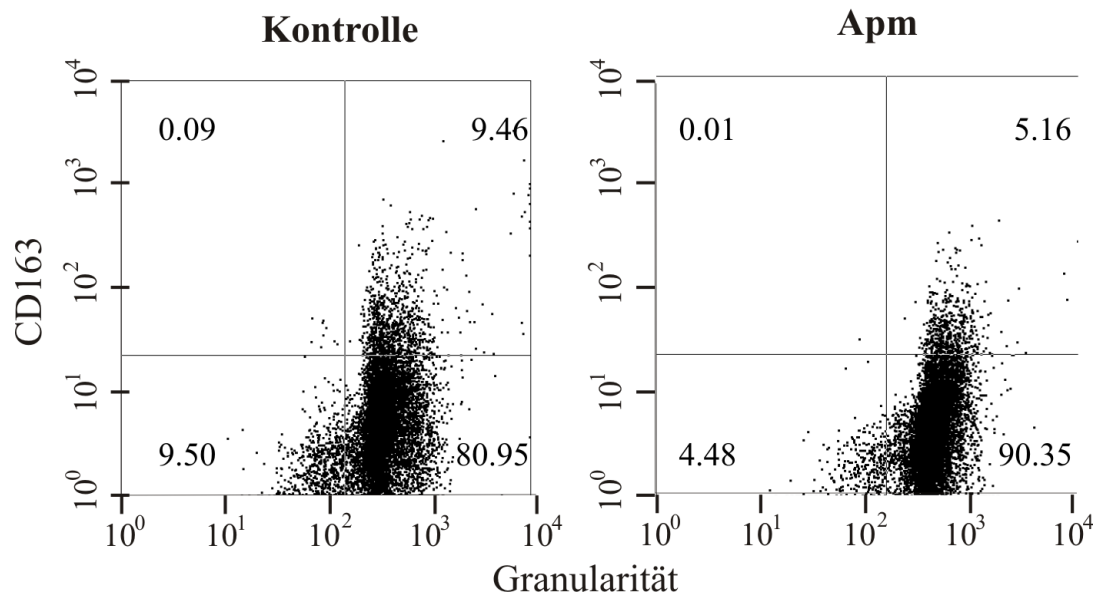


Abb. 10: Durchflusszytometrische Analysen von CD163 auf der Oberfläche von Monozyten, welche mit bzw. ohne 10  $\mu\text{g/ml}$  Adiponektin (Apm) für 24 h inkubiert wurden.

Eine zusammenfassende Quantifizierung der diesbezüglich gewonnenen Ergebnisse der FACS-Analysen zeigte eine Reduktion der CD163-Konzentration um 40-50%, wie aus Abbildung 11 ersichtlich wird.

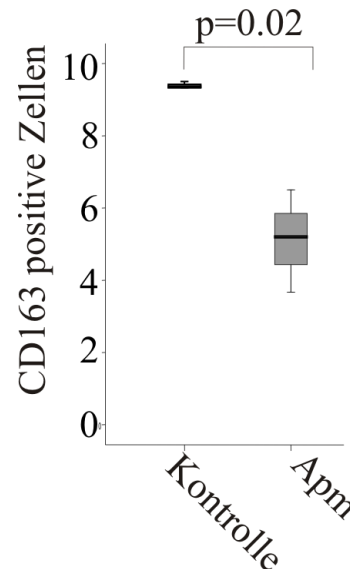


Abb. 11: CD163-Oberflächenexpression in Monozyten, welche mit 10 µg/ml Adiponektin (Apm) stimuliert wurden, verglichen mit Kontrollzellen ohne Adiponektinstimulation.

### 3.1.2 Einfluss von Adiponektin auf die lösliche Form von CD163

In der Annahme, dass die Reduktion der CD163-Expression auf einer Abspaltung des Moleküls von der Zelloberfläche beruht, sollte die Konzentration des löslichen CD163 im Überstand von Zellen, welche mit 10 µg/ml Adiponektin vorinkubiert waren, gemessen werden. Im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Adiponektinstimulation ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen von löslichem CD163 nachweisen. Dies legt den Schluss nahe, dass CD163 entweder nicht von der Zelloberfläche abgespalten wird oder der abgespaltene Anteil im Überstand in einer so geringen Konzentration vorliegt, dass dieser nicht detektiert werden kann. (Abbildung 12)

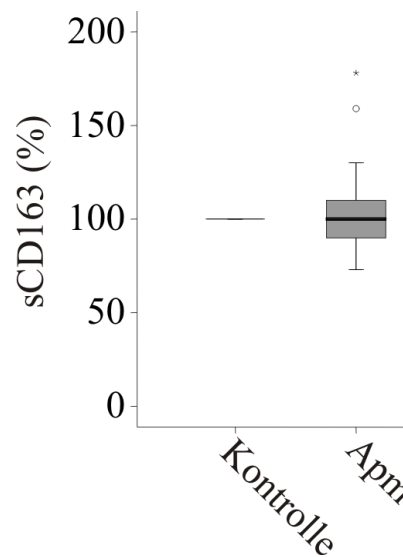


Abb. 12: Konzentration an gelöstem CD163 (sCD163) im Überstand von Monozyten, welche mit bzw. ohne 10 µg/ml Adiponektin (Apm) für 24 h stimuliert wurden.

### 3.1.3 Wirkung von Adiponektin auf die CD163-Expression in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Aus dem Blut dreier gesunder Spender wurden Monozyten isoliert und mit bzw. ohne 10 µg/ml Adiponektin für 12, 18, 24, 30 und 36 h inkubiert, um die Beeinflussung der CD163-Expression in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zu klären. Eine signifikante Reduktion von CD163 konnte nach einer Inkubationsdauer von 18 h nachgewiesen werden. ( $p=0,02$ ) Eine weitere ähnliche Suppression von CD163 zeigte sich nach 24, 30 und 36 h, während die CD163-Konzentration in den Kontrollzellen ohne Adiponektinstimulation völlig unverändert blieb. ( $p=0,02$ )

Die Ergebnisse der entsprechenden Western Blots sind in Abbildung 13 gezeigt. Als Ladungskontrolle diente hierbei wiederum GAPDH.

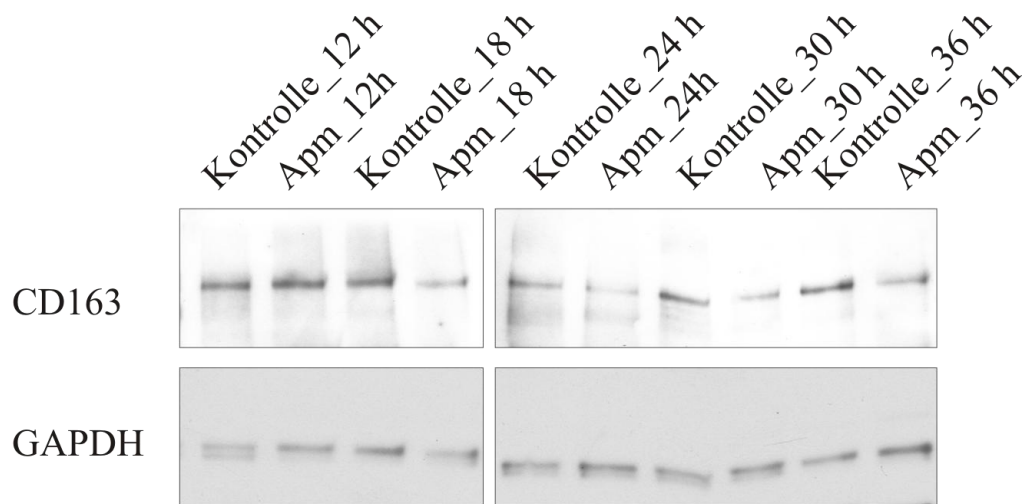


Abb. 13: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche mit 10 µg/ml Adiponektin (Apm) für 12, 18, 24, 30 und 36 h kultiviert wurden.

Auch in dieser Versuchsreihe mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von Adiponektin ließen sich keine signifikanten Veränderungen der Konzentration des löslichen CD163 nachweisen. (Abbildung 14)

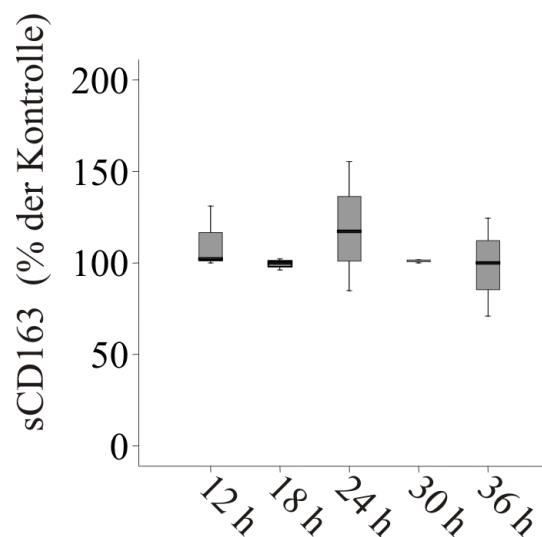


Abb. 14: Lösliches CD163 (sCD163) im Überstand von Zellen, welche mit 10 µg/ml Adiponektin (Apm) für 12, 18, 24, 30 und 36 h inkubiert wurden.



### 3.1.4 Suppression von CD163 in Abhängigkeit von der Adiponektinkonzentration

Des Weiteren sollte der Effekt unterschiedlicher Adiponektinkonzentrationen auf die CD163-Expression untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Monozyten von drei gesunden Probanden für 24 h mit bzw. ohne Adiponektin in aufsteigender Dosierung inkubiert. Die Konzentrationen an Adiponektin betrugen dabei 7,5, 10,0, 12,5 und 15,0 µg/ml. Während das Hormon in einer Konzentration von 7,5 µg/ml keinen Einfluss auf die CD163-Expression zeigte ( $p=0,2$ ), konnte mit einer Dosierung von 10,0 ( $p=0,01$ ), 12,5 ( $p=0,02$ ), und 15,0 µg/ml ( $p=0,02$ ) jeweils eine signifikante Reduktion erzielt werden, wie in Abbildung 15 deutlich wird. Als Ladungskontrolle diente das Enzym GAPDH.

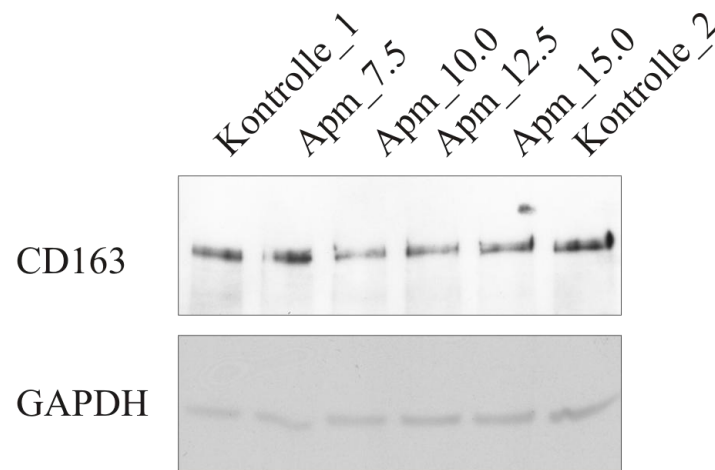


Abb. 15: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche mit 7,5, 10,0, 12,5, und 15,0 µg/ml Adiponektin (Apm) für 24 h stimuliert wurden.

Eine Analyse der Konzentration des löslichen CD163 zeigte auch hier wiederum keine Veränderung hinsichtlich unterschiedlicher Adiponektindosierungen. (Abbildung 16)

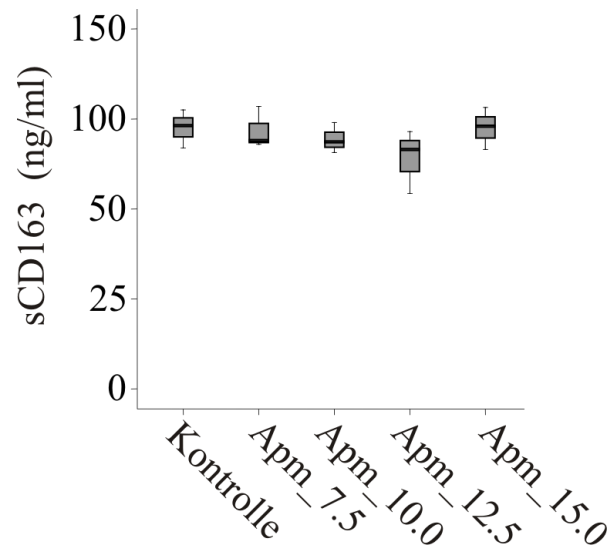


Abb. 16: Konzentration an gelöstem CD163 (sCD163) in ng/ml in Monozyten, welche mit 7,5, 10,0, 12,5 und 15,0  $\mu\text{g/ml}$  Adiponektin (Apm) für 24 h stimuliert wurden.

### 3.1.5 Einfluss von Adiponektin auf die CD163-Expression differenzierter Makrophagen nach Stimulation mit Interleukin 10

Wie Büchler et al. zeigen konnten, wird die Expression des Oberflächenmoleküls CD163 während des Reifungsprozesses von Monozyten zu differenzierten Makrophagen deutlich erhöht. Interleukin 10 bewirkt darüber hinaus eine weitere Steigerung der Proteinkonzentration. [23] Um die Wirkung von Adiponektin auf Monozyten mit einer hohen Dichte von CD163 auf ihrer Zelloberfläche darstellen zu können, wurden Monozyten von zwei gesunden Probanden isoliert und für fünf Tage kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen für weitere 24 h mit 1,5 ng/ml IL 10 inkubiert. Auf der Oberfläche der Makrophagen, welche anschließend für 18, 24, 30 und 36 h mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Adiponektin stimuliert wurden, konnte eine signifikante Reduktion der CD163-Konzentration festgestellt werden.

Eine Veränderung der Konzentration an löslichem CD163 konnte dabei nicht gemessen werden.

Abbildung 17 zeigt eine Übersicht der Wirkung von Adiponektin auf die CD163-Expression IL 10 stimulierter Makrophagen sowie auf die im Überstand gelöste Form des Proteins.

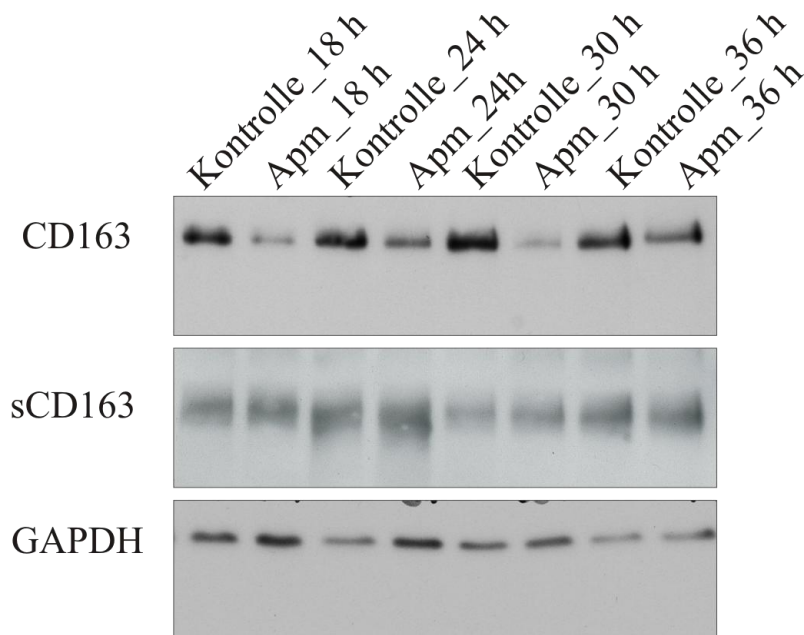


Abb. 17: CD163, sCD163 und GAPDH in Makrophagen, welche für fünf Tage differenziert, anschließend 24 h mit IL 10 kultiviert und für weitere 18, 24, 30 bzw. 36 h mit Adiponektin (Apm) stimuliert wurden im Vergleich zu Makrophagen ohne Adiponektinstimulation.

### 3.2 Auffinden von Signalwegen, die möglicherweise an der Adiponektin-vermittelten Reduktion von CD163 beteiligt sind

#### 3.2.1 Rolle der p38-MAP Kinase in der Reduktion von CD163 durch Adiponektin

Adiponektin aktiviert die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAP Kinase). Um herauszufinden, ob sich auch die Herabregulation von CD163 durch Adiponektin über den MAP Kinase-Weg erklären lässt, wurde die Proteinkaskade durch SB 203580, einen spezifischen Inhibitor der MAP Kinasen, unterbunden. [75-76]

Dazu wurden Monozyten von drei gesunden Spendern isoliert und mit Serum und 100 nM SB 203580 bzw. Serum ohne den MAP Kinase-Inhibitor stimuliert. Die CD163-Konzentration war in beiden Versuchen gleich hoch, wodurch ein Einfluss durch den Inhibitor alleine auf CD163 ausgeschlossen werden konnte. In weiteren Versuchen zeigte sich, dass Adiponektin die CD163-Konzentration auch in den mit dem MAP Kinase-Inhibitor SB 203580 vorinkubierten Monozyten herabreguliert.

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse im Vergleich mit Kontrollzellen ohne vorherige Inhibitorstimulation dargestellt. ( $p=0,03$ )

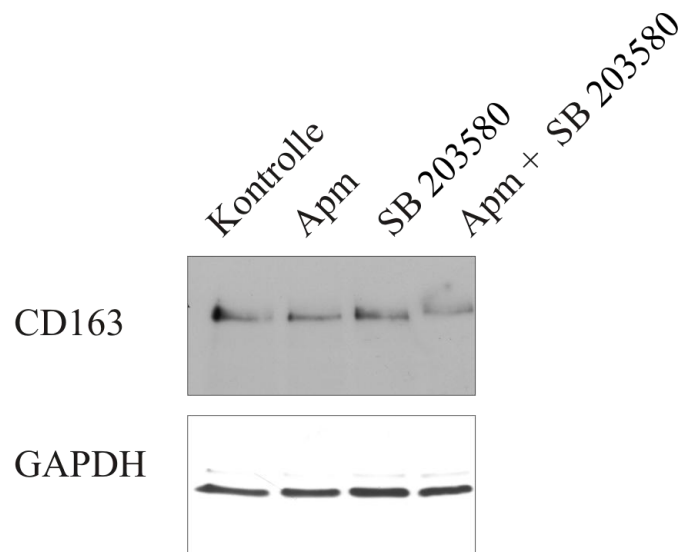


Abb. 18: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche mit Adiponektin (Apm), dem MAP Kinase-Inhibitor SB203580 oder mit einer Kombination aus beiden (Apm + SB 203580) für 24 h stimuliert wurden.

Des Weiteren wurde aus diesen Zellen mRNA gewonnen und anschließend im LightCycler die mRNA-Konzentration gemessen. Es ließ sich keine Reduktion der mRNA-Konzentration in mit Adiponektin stimulierten Zellen nachweisen, während 100 nM SB 203580 die CD163-Expression um etwa 10% im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen reduzierte. ( $p=0,01$ )

Eine ähnliche Reduktion konnte in Monozyten, welche mit Adiponektin und 100 nM SB 203580 für 24h inkubiert wurden, gemessen werden.

### 3.2.2 Aktivierung der AMPK durch Adiponektin, Metformin und AICAR

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist ein heterotrimeres Protein, dessen Aufgabe darin besteht, die Zellen vor einem ATP-Mangel zu schützen. Durch Phosphorylierung hemmt es Enzyme, die für besonders energieaufwendige Stoffwechselprozesse wie etwa die Cholesterin- und Fettsäurebiosynthese verantwortlich sind und wird dabei über den AMP- und ATP-Spiegel der Zelle reguliert.

Die AMPK wird durch Adiponektin und Metformin, einem Wirkstoff aus der Gruppe der Biguanide, der bei nicht-insulinpflichtigem Typ 2 Diabetes mellitus und

Übergewicht eingesetzt wird, aktiviert. Auch das Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid (AICA – Ribonukleotid, AICAR), welches die Glukoseaufnahme der Zelle stimuliert und die Apoptose durch Reduktion reaktiver Sauerstoffkomponenten hemmt, stellt einen Agonisten der AMPK dar.

### 3.2.2.1 Einfluss von Metformin und AICAR auf die CD163-Expression

In Anlehnung an die Gemeinsamkeit der drei Stoffgruppen bezüglich ihrer Aktivierung der AMPK sollte nun untersucht werden, ob auch Metformin und AICAR zu einer Herabregulation der CD163-Konzentration führen, wie dies nach Stimulation mit Adiponektin beobachtet werden kann.

Zu diesem Zweck wurden Monozyten zunächst mit 0,006, 0,003, 0,1 und 0,5 mM Metformin für 24 h inkubiert. Eine signifikante Reduktion der CD163-Expression ließ sich dabei ab einer Konzentration von 0,006 mM Metformin nachweisen, wie aus Abbildung 19 ersichtlich wird. ( $p=0,02$ )

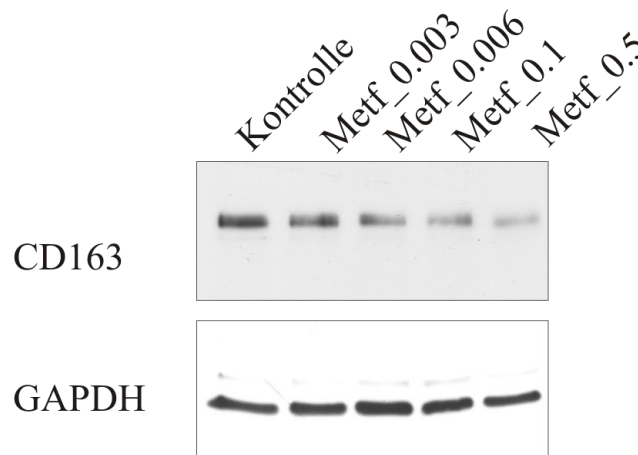


Abb. 19: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche mit 0,003, 0,006, 0,1 bzw. 0,5 mM Metformin (Metf) für 24 h stimuliert wurden.

Eine weitere Abnahme der CD163-Konzentration ließ sich auch nach Stimulation von Monozyten, welche aus dem Blut zweier weiterer gesunder Spender isoliert wurden, mit 0,5 mM AICAR für 24 h nachweisen, wie Abbildung 20 zeigt.

Den drei Stoffgruppen Adiponektin, Metformin und AICAR ist demnach nicht nur die Aktivierung der AMPK, sondern auch die Herabregulation des Proteins CD163 gemeinsam.

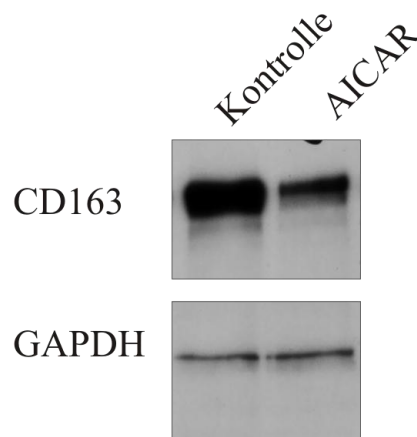


Abb. 20: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche mit 0,5 mM AICAR für 24 h inkubiert wurden.

### 3.2.2.2 Effekt des AMPK – Inhibitors Compound C auf die CD163 – Konzentration

Im Anschluss daran sollte zudem die Frage geklärt werden, ob die Herabregulation der CD163-Expression letztlich auf einer Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase beruht. Aus diesem Grund sollte der AMPK-Weg durch Compound C, einem spezifischen Inhibitor der AMPK, blockiert und die Effekte auf CD163 beobachtet werden. Monozyten wurden deshalb mit 10 µg/ml Adiponektin, mit 1 bzw. 2,5 µM Compound C sowie einer Kombination aus Adiponektin und 1 bzw. 2,5 µM Compound C stimuliert. Wie Abbildung 21 zu entnehmen ist, konnte Compound C in einer Konzentration von 1 µM die durch Adiponektin hervorgerufene Reduktion der CD163-Konzentration nicht supprimieren, während eine Konzentration von 2,5 µM Compound C die CD163-Konzentration bereits in den Kontrollzellen ohne Adiponektin verminderte.

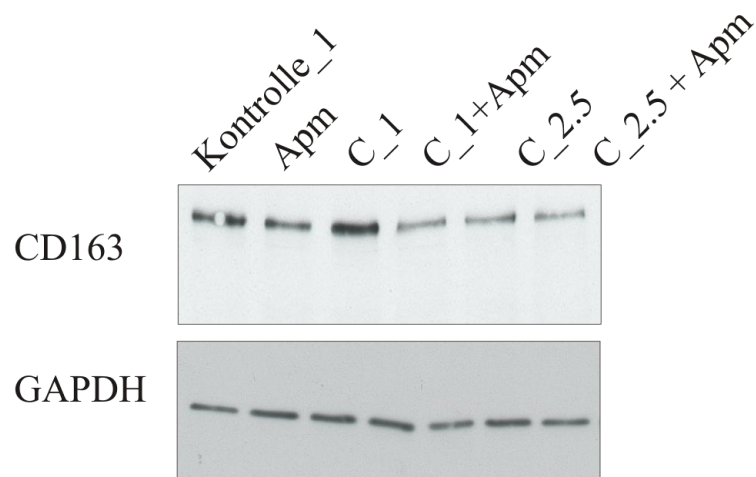


Abb. 21: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche mit Adiponektin (Apm), 1,0 oder 2,5  $\mu$ M Compound C (C) oder einer Kombination aus Adiponektin und 1,0 bzw. 2,5  $\mu$ M Compound C (C + Apm) stimuliert wurden.

### 3.2.2.3 Ausschluss zytotoxischer Effekte von Compound C anhand der Bestimmung von LDH und PARP

Um etwaige zytotoxische Effekte des AMPK-Inhibitors auszuschließen, wurde die LDH-Konzentration mittels ELISA gemessen. Es ließen sich jedoch weder bei einer Konzentration von 1,0  $\mu$ M Compound C noch bei 2,5  $\mu$ M Compound C erhöhte LDH-Werte nachweisen. Auch die Poly- (ADP – Ribose)- Polymerase (PARP), ein Protein, das durch bestimmte Caspasen als zelluläre Antwort auf Umweltstress gespalten wird, war unverändert. (Abbildung 22)

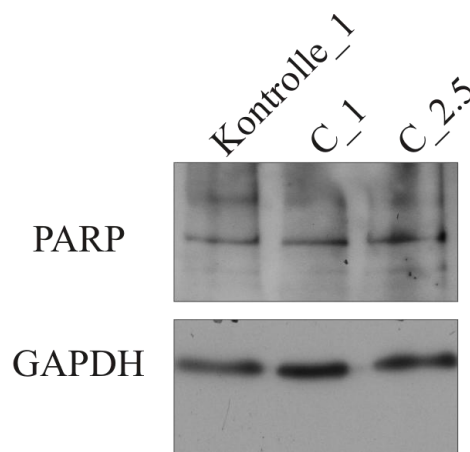


Abb. 22: PARP und GAPDH in Monozyten, welche mit 1,0 bzw. 2,5  $\mu$ M Compound C (C) für 24 h inkubiert wurden.

### 3.3 Einfluss freier Fettsäuren und einer Cholesterindepletion auf die CD163 – Expression in Monozyten

#### 3.3.1 Auswirkung von Palmitin- und Ölsäure auf das monozytäre CD163

Übergewicht und fettreiche Ernährung erhöhen den Gehalt freier Fettsäuren im Blut. Eine erhöhte systemische Konzentration an freien Fettsäuren wiederum trägt unter anderem zu einer Insulinresistenz bei, wie sie für den Diabetes mellitus Typ 2 charakteristisch ist.

In den folgenden Versuchen sollte nun analysiert werden, ob freie Fettsäuren, welche demnach bei Menschen mit Übergewicht und Typ 2 Diabetes mellitus in erhöhter Konzentration vorliegen, per se einen Einfluss auf das monozytäre CD163 ausüben.

Zu diesem Zweck wurden Monozyten aus dem Blut dreier gesunder Spender isoliert und mit Palmitin- bzw. Ölsäure stimuliert. Palmitinsäure, ein wichtiges Zwischenprodukt der Lipogenese, gehört dabei zur Gruppe der gesättigten Fettsäuren, während Ölsäure einen wichtigen Vertreter der einfach ungesättigten Fettsäuren darstellt. Die Monozyten wurden mit 100, 200 und 300  $\mu\text{M}$  Palmitin- bzw. Ölsäure stimuliert und anschließend für 24 h inkubiert. Die Zelllysate wurden mit Western Blot analysiert, welche in Abbildung 23 dargestellt sind. Wie eindeutig zu erkennen ist, führt Ölsäure zu einer Abnahme der CD163-Konzentration, wobei der Effekt mit zunehmender Konzentration der ungesättigten Fettsäure verstärkt wird.

Auch Palmitinsäure vermindert CD163 ab einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$ .

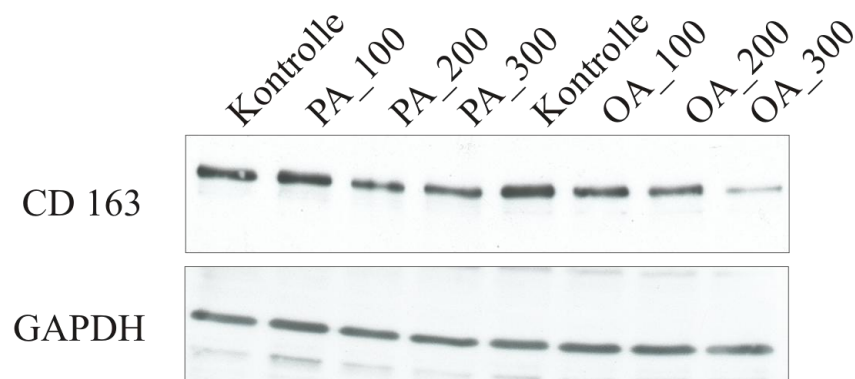


Abb. 23: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche mit 100, 200 oder 300  $\mu\text{M}$  Palmitinsäure (PA) bzw. Ölsäure (OA) für 24 h stimuliert wurden.



### **3.3.2 Einfluss einer kombinierten Stimulation primärer Monozyten mit Fettsäuren und Adiponektin**

Da eine Stimulation primärer Monozyten mit Ölsäure eine Reduktion der CD163-Konzentration zur Folge hat, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, welche Auswirkungen eine gleichzeitige Stimulation der Zellen mit Fettsäuren und Adiponektin hat.

Dazu wurden primäre Monozyten aus dem Vollblut zweier gesunder Spender isoliert und verschiedene Testreihen erstellt. Zwei Testreihen wurden dabei mit Ölsäure allein in einer Konzentration von 200 bzw. 300  $\mu\text{M}$  für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation zweier weiterer Testgruppen mit 200 bzw. 300  $\mu\text{M}$  Ölsäure sowie jeweils 10  $\mu\text{g/ml}$  Adiponektin. Gleichzeitig wurde ein Parallelversuch mit Palmitinsäure durchgeführt.

Wie in Abbildung 24 deutlich zu erkennen ist, liegt die CD163-Konzentration in den Zellen, welche mit Ölsäure stimuliert wurden, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle deutlich reduziert vor. Der Effekt auf CD163 ist dabei, wie im Vorversuch bereits erwähnt, abhängig von der verwendeten Konzentration der Ölsäure. Vergleicht man nun die CD163-Menge in Zellen, welche mit Ölsäure allein bzw. mit Ölsäure und 10  $\mu\text{g/ml}$  Adiponektin inkubiert wurden, so stellt man fest, dass die Reduktion an monozytärem CD163 in den Zellen, welche mit einer Kombination aus Ölsäure und Adiponektin stimuliert wurden, deutlich ausgeprägter ist als in den Zellen, welche nur mit der Fettsäure allein inkubiert wurden. Demnach wird der Effekt der Ölsäure auf die CD163-Konzentration in Monozyten durch Adiponektin verstärkt. Auch hier lässt sich die dosisabhängige Wirkung der Ölsäure nachweisen.

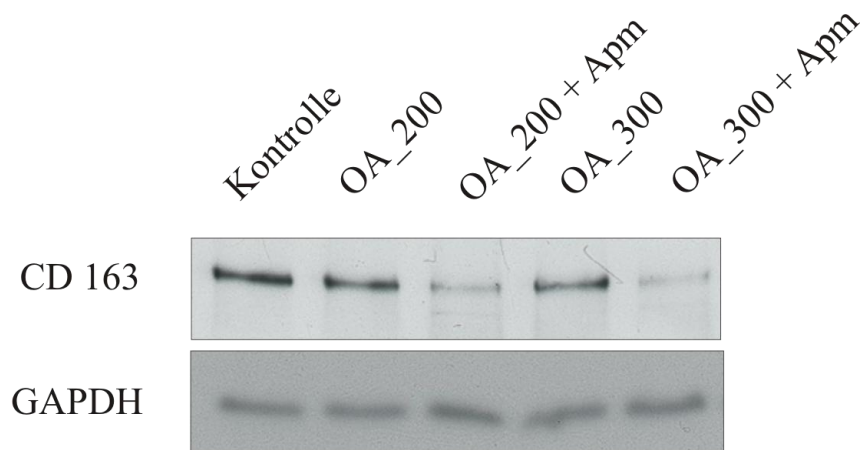


Abb. 24: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche mit 200 oder 300  $\mu$ M Ölsäure (OA) allein oder in Kombination mit 10  $\mu$ g/ml Adiponectin (Apm) über 24 h inkubiert wurden.

Wie in Abbildung 25 hingegen zu erkennen ist, hatte Palmitinsäure im Gegensatz zu den oben gezeigten Versuchen keinen Effekt auf die CD163-Konzentration, was ein Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle zeigt. In Zellen, welche mit Palmitinsäure und 10  $\mu$ g/ml Adiponektin stimuliert wurden, ist die CD163-Konzentration reduziert. Dieser Effekt wird folglich allein durch Adiponektin hervorgerufen.

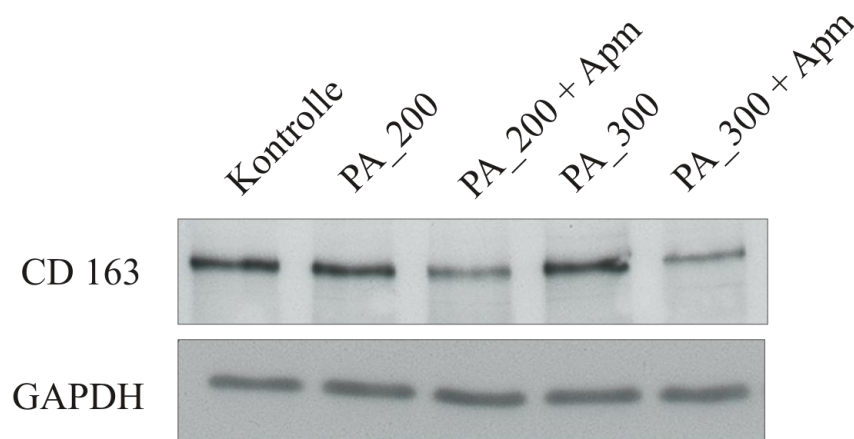


Abb. 25: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche mit 200 oder 300  $\mu$ M Palmitinsäure (PA) allein oder in Kombination mit 10  $\mu$ g/ml Adiponektin (Apm) über 24 h inkubiert wurden.

### 3.3.3 Einfluss von Cyclodextrin und Lovastatin auf die monozytäre CD163-Expression

Im Folgenden sollte der Einfluss von Cyclodextrin und Lovastatin auf CD163 näher untersucht werden. Cyclodextrin stellt eine Verbindung dar, welche zur Gruppe der zyklischen Oligosaccharide gehört und Cholesterin selektiv aus der Zellmembran entfernt. Lovastatin hingegen ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Statine, die zur Behandlung einer Hypercholesterinämie eingesetzt werden. Ihre Wirkung beruht dabei auf einer Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, einem wichtigen Enzym der Cholesterinsynthese.

Um die Wirkung der beiden Stoffgruppen auf das monozytäre CD163 zu analysieren, wurden primäre Monozyten aus dem Vollblut zweier Spender isoliert und anschließend zwei Testreihen erstellt. Die erste Testgruppe wurde mit 5  $\mu$ M Lovastatin stimuliert, während die zweite Testreihe mit 1 ng/ml Cyclodextrin für 18 h inkubiert wurde. Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, zeigte weder Lovastatin noch Cyclodextrin einen Einfluss auf die CD163-Konzentration der Monozyten.

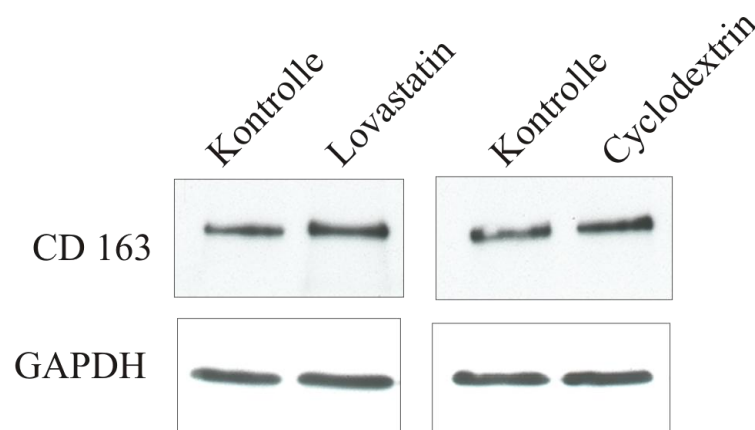


Abb. 26: CD163 und GAPDH in Monozyten, die mit 5  $\mu$ M Lovastatin für 24 h oder 1 ng/ml Cyclodextrin für 18 h inkubiert wurden.

### 3.4 Auswirkung von Adiponektin auf CD163 in Monozyten von Typ 2 Diabetikern, normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

#### 3.4.1 Veränderung der CD163-Expression unter dem Einfluss von Adiponektin in den drei Kollektiven CG1, CG2 und T2D

Wie in den vorherigen Versuchen anschaulich gezeigt werden konnte, wird die CD163-Expression von Monozyten durch Adiponektin herabreguliert. Da die Adiponektinkonzentration im Serum von übergewichtigen und diabetischen Menschen reduziert ist, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob CD163 in den Monozyten dieser Spender erhöht ist. Zu diesem Zweck wurden drei Kollektive erstellt, welche sich aus normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen sowie Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zusammensetzten. Eine Übersicht der drei Kollektive bietet Tabelle 1.

**Tabelle 1** Anthropometrische und biochemische Charakteristika der Studienkollektive, welche für die Isolation der Blutmonozyten verwendet wurden (alle männlich)

	<b>T2D</b>	<b>CG1</b>	<b>CG2</b>	<b>p-Wert</b>
Probanden (n)	n = 11	n = 11	n = 7	
Alter (Jahr)	61 (42-76)	56 (40-63)	55 (49-67)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	32.3 (26.8-45.9)	30.5 (27.2-36.5)	22.8(20.0-24.4)	< 0.001 <sup>§, #</sup>
WHR	1.06 (0.90-1.10)	1.00 (0.94-1.13)	0.92(0.83-0.99)	< 0.001 <sup>§, #</sup>
HDL (mg/dl)	43 (35-71)	44 (34-71)	57 (44-78)	
TG (mg/dl)	150 (88-737)	117 (70-382)	90 (49-163)	
Cholesterin (mg/dl)	175 (126-265)	169 (122-230)	190 (146-211)	

**Medikation**

ACE-Hemmer	2	0	1
Beta Blocker	2	0	0
Diuretika	3	1	0
Lipidsenker	2	1	1
Metformin	6	0	0
Glinide	1	0	0
Nitrate	1	0	0
Glitazone	2	0	0
Insulin	3	0	0

**Adipokine**

Apm (µg/ml)	1.7 (0.6 - 3.9)	2.6 (1.0 - 5.4)	2.4 (1.1 - 4.4)	
IL 6 (pg/ml)	1.5 (0.3 - 9.3)	1.7 (0.3 -4.0)	0.5 (0.03 - 1.6)	0.007 <sup>§</sup> , 0.004 <sup>#</sup>

**Monozyten**

<b>CD163 (au)</b>	5.6 (2.1-11.5)	3.9 (3.3-6.6)	2.7 (2.4-3.6)	0.008 <sup>§</sup> , 0.001 <sup>#</sup>
<b>sCD163 (ng/ml)</b>	76.9(40.5-388.1)	72.0(26.3-129.5)	68.3 (27.0-106)	
<b>IL 6 (pg/ml)</b>	1,100 (41-5,363)	703 (38-5,300)	87 (2.5-1,963)	

*Angiotensin converting enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer), arbitrary units (au), Body mass index (BMI), High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein (LDL), Normalgewichtige Kontrollen (CG2), Übergewichtige Kontrollen (CG1), Typ 2 Diabetiker (T2D), Waist-to-hip-ratio (WHR).*

Signifikanz von T2D gegenüber CG1 = \*, von CG1 gegenüber CG2 = #, von T2D gegenüber CG2 = §

Aus dem Blut der verschiedenen freiwilligen Spender wurden Monozyten isoliert und die CD163-Expression untersucht. Wie Abbildung 27 zeigt, ist CD163 in den Zellen übergewichtiger Kontrollen, verglichen mit den Zellen normalgewichtiger Kontrollen, deutlich höher. Dahingegen finden sich annähernd ähnliche Mengen an CD163 in den Zellen übergewichtiger Probanden und Typ 2 Diabetiker. Die entsprechenden Western Blots zeigt Abbildung 28.

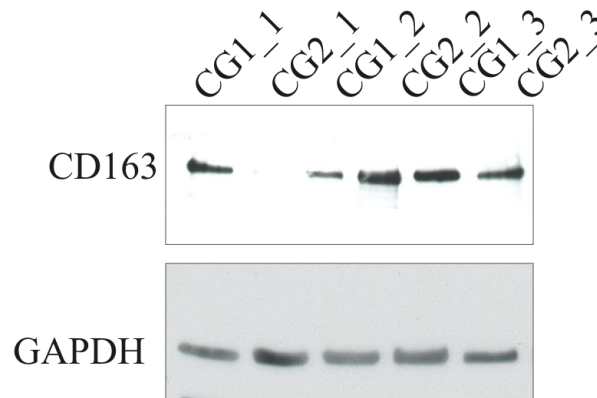


Abb. 27: CD163 und GAPDH in Monozyten, welche aus dem Vollblut von übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen (CG2) Kontrollen isoliert wurden.

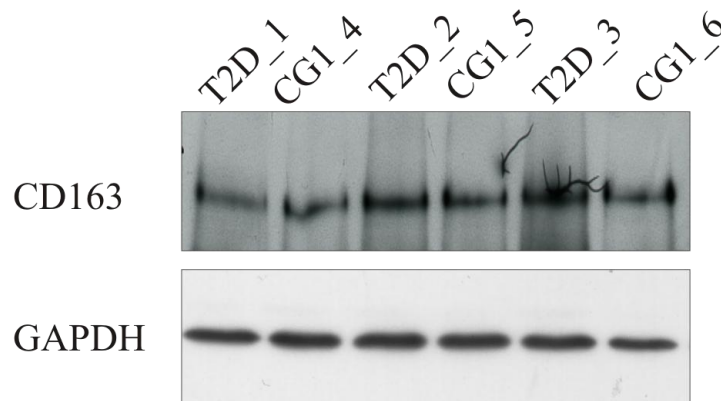


Abb. 28: CD163 und GAPDH in Monozyten isoliert aus dem Vollblut von Typ 2 Diabetikern (T2D) im Vergleich zu übergewichtigen Kontrollen (CG1).

Zusammenfassend sind die Ergebnisse in Form einer Quantifizierung der in Abbildung 27 und 28 gezeigten Western Blots dargestellt. Während die CD163-Konzentration also in den Monozyten übergewichtiger Spender und Patienten mit Typ 2 Diabetes ähnlich war, zeigte sich eine im Vergleich dazu signifikant niedrigere Konzentration an CD163 in den Zellen normalgewichtiger Kontrollen. (Abbildung 29, Tabelle 1)

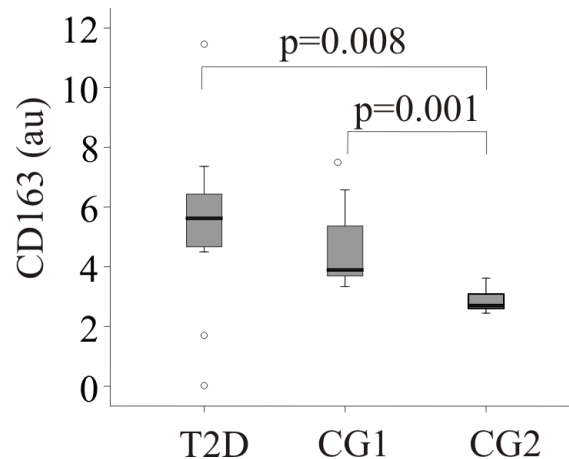


Abb. 29: CD163 in Monozyten von Typ 2 Diabetikern (T2D), übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen Kontrollen (CG2), Angaben in *arbitrary units* (au).

### 3.4.2 Lösliches CD163 im Überstand primärer Monozyten von Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen

Zusätzlich wurde die Konzentration an löslichem CD163 in den Überständen der Monozyten dieser drei Kollektive gemessen. Es ließ sich jedoch bei den Spendern der unterschiedlichen Kohorten keine diesbezügliche Veränderung nachweisen. (Abbildung 30, Tabelle 1)

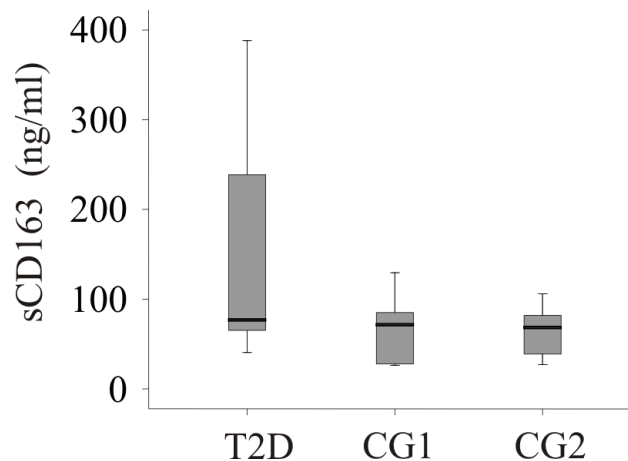


Abb. 30: Konzentration von gelöstem CD163 (sCD163) in ng/ml im Überstand von Monozyten von Typ 2 Diabetikern (T2D), übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen (CG2) Kontrollen.

### 3.4.3 Vergleich der Konzentration an gelöstem CD163 mit der systemischen IL 6-Konzentration und anthropometrischen Daten der Spender

Das proinflammatorische IL 6 wird von Monozyten als Antwort auf einen inflammatorischen Reiz gebildet. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der IL 6-Messungen, welche mittels ELISA in den Überständen und Serumproben bei den Mitgliedern der verschiedenen Kollektive erhoben wurden.

IL 6 im Überstand der Monozyten wies keine Korrelation zum sCD163 in den Überständen auf. Es ergab sich aber eine positive Korrelation des monozytären sCD163 mit dem Serum IL 6 ( $r=0,68$ ,  $p<0,001$ ) und dem Alter der Spender ( $r=0,55$ ,  $p=0,001$ ).

Dahingegen konnte keine Korrelation zwischen monozytärem, löslichem CD163 und dem BMI, der WHR oder dem systemischen Adiponektin gefunden werden.

### 3.4.4 Analyse der sCD163-Konzentration im Serum von Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen und normalgewichtigen Spendern

Um jedoch genauere Informationen hinsichtlich gelöstem CD163 im Serum normalgewichtiger und übergewichtiger Kontrollen sowie Typ 2 Diabetiker zu erhalten, wurde das Spenderkollektiv weiter vergrößert und die Konzentration an gelöstem CD163 mittels ELISA im Serum gemessen.

Eine Übersicht hierfür bietet Tabelle 2.



**Tabelle 2** Anthropometrische und biochemische Charakteristika der Studienkollektive, anhand derer die sCD163-Serumkonzentration gemessen wurde. (alle männlich)

	<b>T2D</b>	<b>CG1</b>	<b>CG2</b>	<b>p-Wert</b>
Probanden (n)	n = 40	n = 40	n = 20	
Alter (Jahr)	64 (45-88)	60 (40-79)	58 (41-69)	0.02 <sup>§</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31.0(21.2-41.7)	28.1(23.9-36.5)	24.2(20.0-27.1)	<0.001 <sup>#,§</sup> ,0.042*
WHR	1.05 (0.90-1.35)	1.03 ( 0.9-1.14)	0.95 (0.83-1.05)	<0.001 <sup>#, §</sup> ,0.031*
Glukose (mg/dl)	123 (69-249)	94 (60-120)	79 (68 -110)	<0.001 <sup>*,§</sup>
HDL (mg/dl)	41 (21-60)	49 (34-78)	53 (38-80)	<0.001 <sup>*,#,\$</sup>
LDL (mg/dl)	77 (42-116)	90 (52-157)	97 (54-122)	<0.001 <sup>*</sup> ,0.036 <sup>§</sup>
<b>Medikation</b>				
ACE-Hemmer	15	8	2	
Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten	8	0	0	
Beta-Blocker	16	3	1	
Diuretika	22	7	1	
Lipidsenker	16	9	4	
Insulin	13	0	0	
Urikostatika	11	1	2	
Metformin	15	0	0	
Sulfonylharnstoffe	8	0	0	
Glinide	1	0	0	
Digitalis	9	0	0	

**Serumproteine**

Apm (µg/ml)	2.8 (0.8-10.6)	2.9 (1.2-9.4)	2.7 (1.1-5.0)	
Leptin (ng/ml)	10.2 (3.0 -82.9)	5.7 (1.6-26.5)	4.8 (1.7-21.3)	0.003*, <0.001 <sup>§</sup>
sCD163 (µg/ml)	1.15(0.43-3.85)	0.98(0.29-2.61)	0.77(0.39-1.47)	0.018 <sup>#</sup> , 0.001 <sup>§</sup>

*Angiotensin converting enzyme-Hemmer* (ACE-Hemmer), *Body mass index* (BMI), *High Density Lipoprotein* (HDL), *Low Density Lipoprotein* (LDL), Normalgewichtige Kontrollen (CG2), Übergewichtige Kontrollen (CG1), Typ 2 Diabetiker (T2D), *Waist-to-hip-ratio* (WHR).

Signifikanz von T2D gegenüber CG1 = \*, von CG1 gegenüber CG2 = #, von T2D gegenüber CG2 = §

Es wurden dabei annähernd gleiche Konzentrationen für übergewichtige Kontrollen und Typ 2 Diabetiker gefunden, die jedoch deutlich höher waren als die Konzentration, welche im Vergleich dazu im Serum normalgewichtiger Kontrollen ermittelt wurden. (Tabelle 2, Abbildung 31)

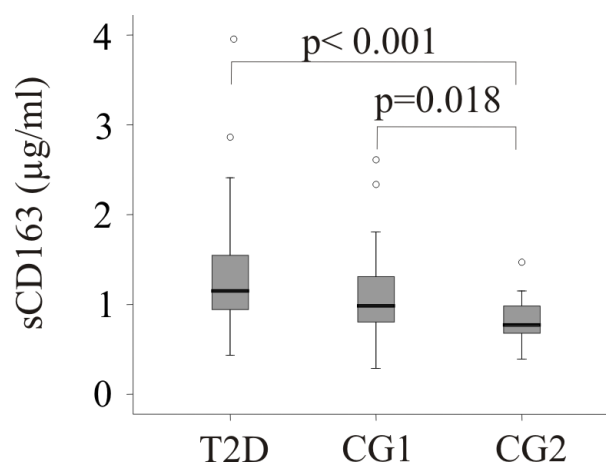


Abb. 31: Konzentration an gelöstem CD163 (sCD163) in µg/ml im Serum von Typ 2 Diabetikern (T2D), übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen (CG2) Kontrollen.

Es konnte lediglich eine positive Korrelation zwischen der Konzentration an löslichem CD163 und dem Alter der Spender nachgewiesen werden. ( $r=0,3$ ,  $p=0,002$ )

### 3.4.5 Lösliches CD163 im Vergleich mit wichtigen Kenngrößen des Cholesterinstoffwechsels und Korrelation mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung

Die Menge an gelöstem CD163 im Serum wurde anschließend in Bezug zu anthropometrischen Größen und den Serumspiegeln von HDL, Gesamtcholesterin und der systemischen Adiponektinkonzentration gesetzt.

Es ließ sich auch hier kein Zusammenhang zwischen gelöstem CD163 und dem BMI bzw. der WHR feststellen. Ebenso verhielt es sich hinsichtlich der Kenngrößen des Cholesterinstoffwechsels sowie systemischen Adiponektins. Ebenfalls fehlten Hinweise auf eine mögliche Korrelation mit sCD163. Da bei 20 der insgesamt 40 untersuchten Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zugleich eine koronare Herzerkrankung diagnostiziert worden war, sollte ein möglicher Bezug zwischen dem Vorliegen einer KHK und einer Veränderung der CD163-Konzentration geklärt werden. Alle Teilnehmer der beiden Kohorten mit bzw. ohne KHK wiesen ähnliche Werte an BMI, WHR, Adiponektin und Alter auf. Die Konzentration an gelöstem CD163 ergab dabei signifikant höhere Werte im Serum der Typ 2 Diabetiker mit KHK im Vergleich zu Typ 2 Diabetikern ohne Gefäßerkrankungen, wie aus Abbildung 32 eindeutig hervorgeht. ( $p=0,006$ )

Die dazu gehörigen Werte betrugen 1,4 (0,9-3,8)  $\mu\text{g/ml}$  an gelöstem CD163 bei Patienten mit KHK im Gegensatz zu 1,1 (0,4-2,0)  $\mu\text{g/ml}$  bei Patienten ohne KHK.

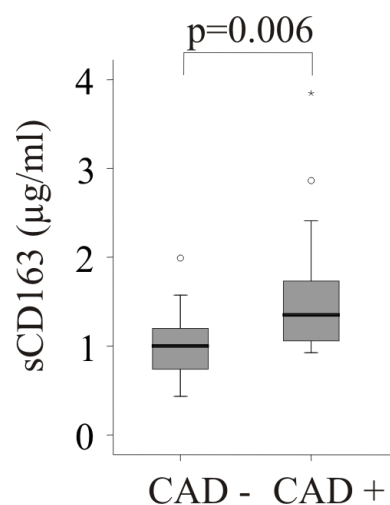


Abb. 32: Konzentration an gelöstem CD163 (sCD163) in  $\mu\text{g/ml}$  im Serum von Typ 2 Diabetikern ohne (CAD-) bzw. mit (CAD+) koronarer Herzerkrankung.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Regulation der CD163-Expression durch Adiponektin**

#### **4.1.1 CD163 – ein Hämoglobin-Scavengerrezeptor mit antiinflammatorischen Eigenschaften**

Im Jahr 1998 zeigte eine deutsche Forschergruppe um Högger P. et al., dass das Protein, welches durch den Antikörper RM3/1 ausschließlich auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen detektiert werden kann, CD163 ist. Lange Zeit war die genaue Bedeutung von CD163 unbekannt. Nachdem CD163 jedoch als ein Mitglied der Familie der cysteinreichen Scavengerrezeptoren klassifiziert werden konnte, wurde das Oberflächenantigen zum Bestandteil zahlreicher Forschungsunternehmungen. [41] Kristiansen et al. gelang es 2001 schließlich als erste, eine der wohl bedeutendsten Funktionen von CD163 aufzudecken: die Entfernung des durch intravaskuläre Hämolyse freigesetzten Hämoglobins und damit der Schutz des Körpers vor der systemischen Toxizität freien Hämoglobins. [51] Wie zukünftige Untersuchungen zeigten, muss CD163 generell eine wichtige Bedeutung im systemischen inflammatorischen Geschehen zugesprochen werden, da die Oberflächenkonzentration von CD163 durch antiinflammatorische Zytokine hochreguliert wird, während unter Einfluss proinflammatorischer Stimuli eine signifikante Reduktion der CD163-Expression zu verzeichnen ist. Seither gilt CD163 als wichtiger Faktor der antiinflammatorischen Antwort des Körpers auf ein Infektgeschehen und kann, wie neueste Untersuchungen belegen, als wichtiger diagnostischer Parameter für inflammatorische Erkrankungen und Sepsis fungieren. [23, 62]

#### **4.1.2 Reduktion der CD163-Proteinexpression in Monozyten durch das Hormon Adiponektin**

In den Formenkreis eben erwähnter Erkrankungen gehört unter anderem das Metabolische Syndrom, da nach heutigem Erkenntnisstand Übergewicht, sowie Typ 2 Diabetes mellitus mit all ihren Folgeerscheinungen als chronische systemische Inflammation angesehen werden müssen. In diesem Zusammenhang wird auch die veränderte Sekretion von Adipokinen im Fettgewebe beobachtet, wobei vor allem die Produktion des Hormons Adiponektin bei übergewichtigen Menschen und Personen

mit Typ 2 Diabetes mellitus signifikant reduziert ist. Eine mögliche Korrelation zwischen Adiponektin und CD163 bzw. eine generelle Beeinflussung der CD163-Regulation durch das Hormon ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. So konnte in den in vitro Studien eindrücklich gezeigt werden, dass das Hormon Adiponektin zu einer signifikanten Reduktion der CD163-Proteinexpression in Monozyten gesunder, normalgewichtiger Spender führt. So ließ sich nach einer Stimulationsdauer von 18 Stunden sowie ab einer Konzentration von 10 µg/ml Adiponektin eine signifikante Herabregulation des monozytenspezifischen Antigens nachweisen.

Das CD163-Antigen wird dabei nicht nur im intrazellulären Kompartiment exprimiert, sondern ist überwiegend auf der Zelloberfläche von Monozyten bzw. Makrophagen lokalisiert. [46] Die Oberflächenkonzentration von CD163 wird, wie bereits erwähnt, durch antiinflammatorische Zytokine wie IL 10 aber auch durch IL 6 hochreguliert. Demnach scheint das Protein eine wichtige Funktion in der systemischen Immunantwort einzunehmen. 2009 postulierte eine Forschergruppe um B.O. Fabrik zudem die Rolle des Proteins als erregerspezifischen Rezeptor für gramnegative und grampositive Mikroben auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen, wodurch CD163 somit auch eine wichtige Funktion in der erregerspezifischen Immunabwehr zugeschrieben werden kann. [56] Unter dem Einfluss von Adiponektin zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD163-Oberflächenkonzentration. Die beobachtete Reduktion von CD163 in Monozyten bzw. Makrophagen könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass CD163 unter dem Einfluss von Adiponektin von der Zelloberfläche abgespalten und ins Serum freigesetzt wird. Adiponektin könnte auch die CD163-mRNA vermindern und somit die Proteinsynthese beeinflussen. Mit Hilfe von LightCycler-Analysen wurde die Konzentration an CD163-mRNA unter dem Einfluss von Adiponektin gemessen. Da hierbei jedoch keine Veränderung der mRNA-Konzentration auftrat, konnte diese Möglichkeit als Erklärung für die beobachtete Reduktion von CD163 durch das Adipokin mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

#### **4.1.3 Effekt von Adiponektin auf die lösliche Form von CD163**

CD163 liegt nicht nur in membrangebundener Form vor, sondern auch als ungebundenes, natürlich im Plasma vorkommendes Protein in gelöster Form. [47] Droste et al. zufolge wird das membrangebundene Protein unter dem Einfluss proinflammatorischer Stimuli von der Zelloberfläche abgespalten, wodurch es

konsekutiv zu einem Anstieg der Konzentration der gelösten Form im Plasma kommt. [24] Um die Möglichkeit zu überprüfen, dass CD163 auch unter dem Einfluss von Adiponektin von der Zelloberfläche abgespalten wird, wurde in den folgenden Experimenten die Konzentration an gelöstem CD163 im Überstand der Zellen bestimmt. Es konnten jedoch keine erhöhten Spiegel an sCD163 nachgewiesen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Reduktion der CD163-Oberflächenexpression nicht auf einer Abspaltung von der Zelloberfläche beruht oder aber die Konzentration an abgespaltenem Protein so gering war, dass sie mit den zur Verfügung stehenden Messmethoden nicht detektiert werden konnte.

#### **4.1.4 Auswirkung von Adiponektin auf die membrangebundene und lösliche Form von CD163 in differenzierten Makrophagen nach IL 10-Stimulation**

Monozyten zirkulieren für ein bis drei Tage im Blutkreislauf. Innerhalb dieses Zeitraums wandern sie in Gewebe ein und differenzieren sich zu Gewebsmakrophagen. Während dieses Reifungsprozesses wird die mRNA und Proteinexpression von CD163 stark induziert. [23] Dies konnten Büchler et al. in Versuchen, in welchen mit Hilfe des Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktors (M-CSF) eine Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen erfolgte, anschaulich nachweisen. Daher bestimmt wahrscheinlich das von Makrophagen freigesetzte sCD163 den systemischen CD163-Spiegel. [23] Um zu klären, ob Adiponektin CD163 auch in Zellen mit einer hohen CD163-Expression verringert, wurden Monozyten mit M-CSF zu Gewebsmakrophagen differenziert und anschließend mit IL 10 behandelt. Adiponektin zeigte ähnliche Effekte wie schon zuvor auf unstimulierte Monozyten. Auch hier kam es unter dem Einfluss von Adiponektin zu einer signifikanten Reduktion der CD163-Proteinexpression. Allerdings konnten keine erhöhten Konzentrationen an löslichem CD163 im Zellüberstand nachgewiesen werden.

## **4.2 MAP Kinase und AMPK als mögliche Zielproteine in der Adiponektin-vermittelten Reduktion der CD163-Expression in Monozyten**

### **4.2.1 Der MAP Kinase-Weg als möglicher Signalweg der Adiponektin-vermittelten CD163-Reduktion**

Der MAP Kinase-Weg umfasst eine Reihe von Signaltransduktionswegen, welche unter anderem an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Apoptose beteiligt sind. Die Signaltransduktionswege beinhalten dabei mindestens drei nacheinander geschaltete Kinasen, welche nacheinander phosphoryliert und dadurch aktiviert werden. Die MAP Kinasen selbst stellen dabei Proteinkinasen mit einem Molekulargewicht von 36.000-44.000 Da dar, welche andere Proteine an spezifischen Serin- bzw. Threoninresten phosphorylieren und deshalb als Serin- bzw. Threonin-Kinasen bezeichnet werden. Die Aktivierung der MAP Kinasen selbst erfolgt wiederum durch Phosphorylierung. Bezüglich ihrer verschiedenen aktivierenden Liganden, aber auch ihrer Wirkung unterscheidet man drei verschiedene Gruppen von MAP Kinasen: die „*extracellular signal regulated*“, Kinasen (ERK), die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) sowie die p38-MAP Kinasen. [77-78] Adiponektin erhöht über eine p38-MAP Kinase abhängige Signaltransduktion die IL 6- und IL 8-Produktion in Monozyten. Wie Weigert et al. zeigen konnte, ist dieser p38-MAP Kinase vermittelte Effekt bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen Personen signifikant reduziert. [75-76] Da demzufolge Adiponektin zu den Agonisten der p38-MAP Kinasen gehört, sollte geklärt werden, ob die durch Adiponektin ausgelöste Reduktion des monozytären CD163 durch eine Aktivierung der p38-MAP Kinase erfolgt. Aus diesem Grund wurde dieser Signaltransduktionsweg durch einen spezifischen Inhibitor der MAP Kinasen, SB203580, blockiert. Wie aus unseren Ergebnissen jedoch eindeutig hervorgeht, führt Adiponektin trotz Inhibition des MAP Kinase-Weges zu einer signifikanten Reduktion von CD163. Daraus kann gefolgert werden, dass die Regulation des Oberflächenproteins durch Adiponektin nicht über eine Aktivierung der p38-MAP Kinase geschieht.

#### **4.2.2 Aktivierung der AMPK durch Adiponektin, Metformin und AICAR**

Ein weiteres Enzym, welches unter anderem durch Adiponektin aktiviert wird, ist die AMPK. Die AMPK wird auch als Sensor der zellulären Energie-Homöostase bezeichnet, da es eine Schlüsselfunktion bei der Regulation des zellulären Energiehaushaltes einnimmt. Die Regulation des Enzyms ist dabei exakt an die vorliegenden ATP- bzw. AMP-Spiegel der Zelle angepasst. So wird die AMPK durch fallende ATP-Spiegel oder steigende AMP-Mengen aktiviert, während eine Akkumulation von ATP zu einer Hemmung des Proteins führen. Die AMPK ist so in der Lage eine ultrasensitive Reaktion auf die jeweiligen intrazellulären Energieverhältnisse zu liefern und somit die Energieversorgung der Zelle mittels ATP zu gewährleisten. Als heterotrimäres Protein besteht die AMPK aus einer katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit und zwei regulatorischen Einheiten, welche als  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bezeichnet werden. Steigt der AMP-Spiegel in der Zelle an, bindet AMP an die regulatorische  $\gamma$ -Untereinheit, was wiederum eine Phosphorylierung eines Threoninrestes der  $\alpha$ -Einheit und damit eine Aktivierung der AMPK zur Folge hat. In aktiviertem Zustand führt die AMPK zu einer Initiierung kataboler, ATP-generierender Stoffwechselwege, wie zum Beispiel der Fettsäuresynthese und Glykolyse. Anabole und demzufolge ATP-verbrauchende Prozesse wie etwa die Lipogenese werden dagegen gehemmt. [79-85] Da gerade diese Stoffwechselwege wichtige Ansatzpunkte bei der Entstehung von Übergewicht und Typ 2 Diabetes sind, ist die AMPK immer mehr in den Vordergrund pharmazeutischer Versuche gerückt, das Metabolische Syndrom zu therapieren. So ist das AMPK-System eines der Ziele antidiabetischer Medikamente wie z.B. Metformin, das zur Stoffgruppe der Biguanide gehört. Der positive Effekt auf den gesamten Stoffwechsel lässt darauf schließen, dass durch eine pharmazeutische Aktivierung der AMPK das Risiko für Typ 2 Diabetes, das Metabolische Syndrom und kardiovaskuläre Erkrankungen deutlich gesenkt werden kann. [79-80] Die AMPK ist jedoch nicht nur in der Lage, die intrazelluläre Energiehomöostase zu kontrollieren, sondern auch an der Koordination der Energiebereitstellung auf Gesamtkörperebene teilzunehmen, indem sie auf Prozesse wie die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch Einfluss nimmt. Ihr Einfluss wird dabei maßgeblich durch Hormone und Zytokine wie etwa Adiponektin, Leptin oder Resistin moduliert. [79-80] Als weitere Stoffgruppe, welche als Agonisten der AMPK fungieren und somit an der Energiebereitstellung beteiligt sind, sind die AICA-Ribonukleotide (AICAR) zu nennen. Diese stellen wichtige Zwischenprodukte



des Purinstoffwechsels dar und gelten als Vorstufen des Inosinmonophosphates (IMP). Neben seinen positiven Effekten auf den Energieumsatz, wodurch AICAR mittlerweile auch zum Kreis der verbotenen Substanzen des Dopings gezählt wird, besitzt das Ribonukleotid die Fähigkeit, die Apoptose von Zellen zu unterdrücken, indem es die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale reduziert.

#### **4.2.2.1 Reduktion von CD163 durch Adiponektin, Metformin und AICAR**

Hinsichtlich der Gemeinsamkeit der drei Stoffgruppen Adiponektin, Metformin und AICAR, das Enzym AMPK zu aktivieren, sollte nun untersucht werden, ob die durch Adiponektin vermittelte Reduktion von monozytärem CD163 auch durch Metformin oder AICAR hervorgerufen wird. Die zu diesem Zweck mit Metformin stimulierten primären Monozyten aus dem Vollblut gesunder, normalgewichtiger Spender zeigten eine signifikante Reduktion der CD163-Proteinexpression. Dieser Effekt konnte ab einer Konzentration von 0,006 mM Metformin nachgewiesen werden. Auch eine Inkubation der Zellen mit AICAR führte zu einer deutlichen Herabregulation der CD163-Proteinexpression primärer Monozyten. Ob die hier in vitro nachgewiesene Reduktion von CD163 ebenso in vivo von Bedeutung ist und inwieweit dies eine Rolle für die protektiven Eigenschaften von Metformin spielt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

#### **4.2.2.2 Der AMPK-Weg als möglicher Signalweg der Adiponektin-vermittelten CD163-Reduktion**

Im Hinblick darauf, dass Adiponektin, Metformin und AICAR unabhängig voneinander zu einer Herabregulation von CD163 führen und jeweils als Agonisten der AMPK fungieren, lässt konsequent die Vermutung zu, dass der gemeinsame Effekt der drei Stoffgruppen auf CD163 durch eine Aktivierung der AMPK vermittelt wird. Ein relativ spezifischer Inhibitor der AMPK, nämlich Compound C, konnte die CD163-Reduktion aber nicht unterdrücken. Stattdessen bewirkte eine Inkubation der Zellen mit Compound C allein bereits eine Reduktion von CD163. Die Herabregulation der CD163-Proteinexpression durch Adiponektin beruht demzufolge nicht auf einer Aktivierung der AMPK; möglicherweise ist aber auch Compound C ein weniger spezifischer Inhibitor als bisher vermutet.

### **4.3 Freie Fettsäuren als wichtige Komponenten in der Entstehung von Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2 und atherosklerotischen Gefäßerkrankungen bei übergewichtigen Menschen**

Übergewicht ist mit einer Vielzahl von Folgeerkrankungen assoziiert, wobei insbesondere die Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 weitreichende Konsequenzen für den Organismus darstellen. In der Pathogenese der Insulinresistenz übergewichtiger Menschen scheinen dabei freie Fettsäuren eine wichtige Schlüsselrolle einzunehmen. Im Plasma adipöser Personen ist ihre Konzentration stark erhöht, was als direkte Ursache der muskulären und hepatischen Insulinresistenz gesehen wird. [86-87] Im Skelettmuskel hemmen freie Fettsäuren die insulininduzierte Glukoseaufnahme in die Zelle sowie die Produktion von Glykogen durch Inhibition der Glykogen-Synthase. Wie Boden et al. beschreibt, erfolgt dies durch eine Akkumulation von intramyozellulären Triglyzeriden und Diacylglycerol und durch eine Aktivierung der Proteinkinase C. In der Leber dagegen hemmen freie Fettsäuren in erhöhter Konzentration die insulinvermittelte Suppression der Glykogenolyse. [88] Diese Veränderungen haben eine erhöhte systemische Glukosekonzentration zur Folge. Trotzdem entwickeln nur etwa 20% der übergewichtigen Menschen mit Insulinresistenz einen Diabetes mellitus Typ 2. Der Grund hierfür ist darin zu sehen, dass freie Fettsäuren für etwa 30-50% der basalen Insulinsekretion verantwortlich sind und darüberhinaus die glukosestimulierte Sekretion von Insulin in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas potenzieren. Der Großteil der Patienten, etwa 80%, ist somit in der Lage, ihre durch die freien Fettsäuren verursachte Insulinresistenz durch diese erhöhte Insulinsekretion zu kompensieren. Personen, die hingegen eine genetische Prädisposition bzgl. der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes besitzen, werden als „lipidblind“ bezeichnet, d.h. sie sind unfähig, ihre Insulinresistenz durch die fettsäurevermittelte Insulinübersekretion der  $\beta$ -Zellen auszugleichen. Die daraus resultierende Hyperglykämie ist dann häufig Ausgangspunkt einer Diabeteserkrankung. [87-89] Neben ihrer Beeinflussung des Glukose-Insulin-Stoffwechsels bewirken freie Fettsäuren über eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B -Signalweges eine geringgradige systemische Inflammation. [87, 90]

#### **4.3.1 Beeinflussung der systemischen Adiponektinkonzentration durch freie Fettsäuren**

Wie bereits erwähnt, stellt eine erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren bei übergewichtigen Menschen den Ausgangspunkt für die Entwicklung von Insulinresistenz und atherosklerotischen Gefäßerkrankungen dar. Es ist demnach nicht verwunderlich, dass auch Adiponektin mit seinen antidiabetischen, antiinflammatorischen und antiatherogenen Eigenschaften durch pathologisch erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren beeinflusst wird. Wie eine Forschergruppe um Bobbert et al. in vivo zeigen konnte, führt eine akute Hyperlipidämie zu einer signifikanten Reduktion des systemischen Adiponektinspiegels, wobei zwischen den einzelnen Isoformen des Adiponektin differenziert werden kann. So stellte sich heraus, dass eine erhöhte Konzentration an Fettsäuren in erster Linie eine Reduktion der MMW-Isoform von Adiponektin zur Folge hat, während die Konzentration der LMW- und HMW-Form des Adiponektins gleich blieb. [91] Die verminderte Konzentration an systemischem Adiponektin, welches im Plasma übergewichtiger Menschen beobachtet wird, ist somit unter anderem Folge der bei Übergewicht erhöhten Menge an freien Fettsäuren.

#### **4.3.2 Reduktion der CD163-Proteinexpression in Monozyten durch freie Fettsäuren**

Auch die Expression von CD163 auf der Zelloberfläche von Monozyten wird durch die Konzentration an freien Fettsäuren moduliert. Wie sich in unseren in vitro Studien zeigte, sind Ölsäure und Palmitinsäure in der Lage, eine Reduktion von CD163 zu bewirken. Die Suppression des Oberflächenantigens ist insbesondere bei einer Stimulation der Zellen mit Ölsäure von der verwendeten Konzentration abhängig und ist dabei umso ausgeprägter, je höher die Konzentration der Fettsäuren gewählt wird. In Versuchen, in denen Monozyten mit einer Kombination aus Adiponektin und Fettsäuren stimuliert wurden, erwies sich zudem eindrucklich, dass die durch Adiponektin vermittelte Reduktion der CD163-Proteinexpression durch Ölsäure potenziert wird. Für Palmitinsäure konnte dieser Effekt jedoch nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen beruhen bisher nur auf in vitro Studien. Sollte sich die Reduktion von CD163 durch freie Fettsäuren auch in vivo nachweisen lassen, so könnte dies als weiterer Hinweis auf die proinflammatorischen Eigenschaften freier

Fettsäuren gedeutet werden, da sie zu einer Herabregulation von CD163, einer wichtigen Komponente in der antiinflammatorischen Phase der Inflammation, führen. Des Weiteren ist nicht geklärt, inwieweit hier eine vermehrte Abspaltung von CD163 eine Rolle spielt.

#### **4.3.3 Auswirkung einer Cholesterindepletion mittels Lovastatin und Cyclodextrin auf die monozytäre CD163-Expression**

Lovastatin und Cyclodextrin sind Vertreter unterschiedlicher Stoffgruppen, die zelluläres Cholesterin vermindern. Während Cyclodextrin die Eigenschaft aufweist, selektiv Cholesterin aus der Plasmamembran zu entfernen, führt Lovastatin durch eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zu einer Suppression der Cholesterinsynthese. Monozyten, die mit Cyclodextrin bzw. Lovastatin stimuliert wurden, zeigten jedoch keine Veränderung ihrer CD163-Proteinexpression. Eine Cholesterindepletion mittels der beiden genannten Stoffgruppen hatte demnach im in vitro Experiment keine Auswirkung auf die CD163-Expression von Monozyten, wohingegen eine erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren zu einer Reduktion des Oberflächenantigens führte.

#### **4.4 CD163 in den drei Spenderkollektiven Typ 2 Diabetiker, übergewichtige und normalgewichtige Kontrollen**

##### **4.4.1 Das Fettgewebe - ein endokrines Organ mit einer Vielfalt an Effekten auf den gesamten Organismus**

Lange Zeit wurde angenommen, dass weißes Fettgewebe ausschließlich der Energiespeicherung bzw. der Energiebereitstellung dient. Wie Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigten, musste diese Meinung grundsätzlich revidiert werden. Demnach stellt das weiße Fettgewebe eines der bedeutendsten endokrinen Organe des menschlichen Körpers dar. Mit seinen vielfältigen metabolischen und immunologischen Funktionen ist es sowohl an der erworbenen als auch an der angeborenen Immunantwort beteiligt. Adipozyten produzieren eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine wie IL 6 und TNF  $\alpha$  sowie ein breites Spektrum an Toll-Like-Rezeptoren, wodurch sie in der Lage sind, auf mikrobielle Antigene zu reagieren. Darüber hinaus sind Adipozyten fähig, eine große Menge an

verschiedenen Adipokinen, wie etwa Leptin oder Adiponektin, zu sezernieren, welche wiederum die Funktion von Monozyten und Makrophagen modulierend beeinflussen. [92-94] Es ist demnach leicht nachzuvollziehen, dass Veränderungen des Fettgewebes, z.B. eine starke Vermehrung der Fettgewebssmasse, wie dies bei Übergewicht der Fall ist, z.T. erheblich negative und sogar schädigende Auswirkungen auf den Körper haben können. So gilt Übergewicht, insbesondere eine Vermehrung der viszeralen Körperfettmasse, als Hauptkomponente für die Entstehung des Metabolischen Syndroms sowie atherosklerotischer Gefäßerkrankungen. [95-96]

#### **4.4.2 Veränderte Sekretion des Hormons Adiponektin bei Diabetes mellitus Typ 2 und Übergewicht im Vergleich zu normalgewichtigen, gesunden Kontrollen**

Eine Zunahme der Körperfettmasse führt zu einer veränderten Sekretion der von Adipozyten sezernierten Adipokine. Waki et al. zufolge ist die Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 zu einem großen Teil auf eine Dysregulation dieser Faktoren bei Übergewicht zurückzuführen. [93] Demnach werden Adipokine mit proinflammatorischen Eigenschaften überproduziert, während Adipokine, welche antiinflammatorisch und insulinsensibilisierend wirken, wie z.B. Adiponektin, in zu geringen Mengen sezerniert werden. [97]

Entgegen der Erwartung im Plasma übergewichtiger Probanden und Patienten mit Typ 2 Diabetes eine erniedrigte Konzentration an systemischen Adiponektin vorzufinden [98], zeigten die vorgenommenen Analysen annähernd gleiche Konzentrationen systemischen Adiponektins bei Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können z.T. dadurch erklärt werden, dass eine große Variation der Adiponektinkonzentration innerhalb der drei Studienkohorten bestand. Laut neuesten Untersuchungen sind erhöhte Spiegel systemischen Adiponektins auch als Konsequenz einer eingeschränkten Nierenfunktion zu sehen und stellen darüber hinaus bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung einen negativen Prädiktor hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse dar. Diese Ergebnisse implizieren demzufolge eine äußerst komplexe und multifaktorielle Verbindung zwischen erhöhten Adiponektinkonzentrationen, Übergewicht, Nierenfunktion und kardiovaskulären Herzerkrankungen. [99-100]

#### **4.4.3 CD163-Expression in Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 sowie übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen**

Die Expression von CD163 auf der Oberfläche von Monozyten unterliegt unter anderem einer Regulation durch pro- und antiinflammatorische Stimuli, wodurch das Antigen eine wichtige Rolle in der Infektabwehr zu spielen scheint. Da auch Übergewicht und damit verbundene Komplikationen wie etwa Diabetes mellitus Typ 2 oder atherosklerotische Gefäßerkrankungen mit einer niedriggradigen, chronischen Inflammation einhergehen, war es für uns von Interesse, mögliche Auswirkungen der genannten Stoffwechselerkrankungen auf die CD163-Konzentration in Monozyten im Vergleich zu gesunden, normalgewichtigen Kontrollen aufzudecken. Unseren Ergebnissen zufolge ist die CD163-Konzentration bei Monozyten von übergewichtigen Personen und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zu normalgewichtigen Spendern erhöht. Vergleicht man die CD163-Expression in übergewichtigen Kontrollen und Typ 2 Diabetikern untereinander, so findet man annähernd gleich hohe Werte des Proteins. In einer Studie von Levy et al. hingegen wurde eine verminderte Menge an CD163-exprimierenden Makrophagen bei Typ 2 Diabetes beobachtet. Es wurde dabei die These aufgestellt, dass Diabetes mellitus, aber auch der Haptoglobin Genotyp 2-2 mit einer höheren Inzidenz an akutem Myokardinfarkt korreliert, als dies bei Nicht-Diabetikern oder Menschen mit dem Haptoglobin-Genotyp 1-1 oder 2-1 der Fall ist. Als Ursache hierfür wird die verminderte Expression des monozyten- bzw. makrophagenspezifischen Hämoglobin-Scavengerrezeptor angegeben und der damit verbundenen Einschränkung, extrakorpuskuläres Hämoglobin in adäquatem Maß aus dem Körper zu entfernen. In Anbetracht der unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der CD163-Konzentration bei Diabetes kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse beider Forschungsgruppen nur schwer verglichen werden können. In der Studie von Levy et al. konnten keinerlei Angaben über anthropometrische Daten der Studienteilnehmer gemacht werden. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass in unserer Arbeit das gesamte zelluläre CD163 untersucht wurde, während in der Levy-Studie ausschließlich membrangebundenes CD163 analysiert wurde. Zudem ist anzumerken, dass Monozyten bei Übergewicht ähnlich wie Makrophagen trotz erhöhter CD163-Konzentrationen höhere Spiegel an inflammatorischen Zytokinen produzieren. [73]

#### **4.4.4 Lösliches CD163 in den drei Studienkohorten Typ 2 Diabetiker, übergewichtige und normalgewichtige Kontrollen im Vergleich**

Während die Konzentration an membrangebundenem CD163 in Monozyten von Typ 2 Diabetikern und Probanden mit Übergewicht im Vergleich zu gesunden, normalgewichtigen Kontrollen signifikant erhöht war, zeigte eine Analyse der gelösten Form des Antigens annähernd gleich hohe Konzentrationen an sCD163 im Überstand der Monozyten der drei Kohorten. Darüber hinaus konnte keine Korrelation zwischen der membrangebundenen und der gelösten Form des CD163 nachgewiesen werden.

#### **4.4.5 Effekt von Adiponektin auf das monozytäre CD163 in den drei Kohorten Typ 2 Diabetiker, übergewichtige und normalgewichtige Kontrollen**

Nachdem in den in vitro Versuchen eindrücklich gezeigt werden konnte, dass es unter Stimulation von Monozyten und Makrophagen mit Adiponektin zu einer signifikanten Herabregulation der CD163-Proteinexpression kommt, war es nun von besonderem Interesse, zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen dem Adipokin und CD163 vor dem Hintergrund verschiedener Stoffwechsel-verhältnisse der Studiengruppen besteht. Bei einer näheren Analyse der systemischen Adiponektinkonzentration und der Konzentration an CD163 der zugehörigen Blutspender erwies sich jedoch, dass weder zelluläres noch gelöstes CD163 mit der systemischen Konzentration an Adiponektin korreliert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Regulation von CD163 bei Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 einem weitaus komplexeren Mechanismus unterliegt. So scheint es sehr wahrscheinlich, dass eine Vielzahl von zusätzlichen Faktoren, die im Rahmen des Metabolischen Syndroms verändert sind, an der Regulation von CD163 auf der Zelloberfläche von Monozyten bzw. Makrophagen beteiligt ist.

#### **4.4.6 Einfluss von IL 6 auf die lösliche Form von CD163 bei Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen**

Einer der Faktoren, welche im Rahmen des Metabolischen Syndroms verändert und an der Regulation des monozytären CD163 beteiligt sein könnte, ist das proinflammatorische Zytokin IL 6. IL 6 stellt eines der wichtigsten Zytokine im Rahmen des Infektgeschehens dar, da es sowohl anti- als auch proinflammatorische

Eigenschaften besitzt und durch Rekrutierung von CD3-positiven T-Lymphozyten am Übergang der angeborenen zur erworbenen Immunantwort beteiligt ist. [101] Wie Schober et al. nachweisen konnten, ist sowohl die systemische wie auch die monozytäre Konzentration des Interleukins bei Übergewicht signifikant erhöht. [102] Darüber hinaus gilt IL 6 als starker Induktor von CD163, wie Böhler et al. in vitro eindeutig darlegen konnten. [23] Eine Analyse der Konzentration an löslichem CD163 im Überstand der Zellen im Vergleich mit der IL 6-Konzentration der entsprechenden Studienteilnehmer zeigte eine positive Korrelation zwischen der gelösten Form des Proteins und dem systemischen IL 6. Monozytäres IL 6 dagegen korrelierte nicht mit löslichem CD163. Aus dieser Beobachtung kann somit geschlossen werden, dass systemisches IL 6 zu einer erhöhten Konzentration an löslichem CD163 beiträgt, während ein autokriner oder parakriner Einfluss des monozytären IL 6 auf die Produktion von sCD163 der Zellen unwahrscheinlich ist.

#### **4.4.7 Lösliches CD163 im Serum von Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Kontrollen im Vergleich zu normalgewichtigen, gesunden Spendern**

Nachdem die Konzentration an löslichem CD163 im Überstand der Zellen von Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen und normalgewichtigen Spendern keine wesentlichen Unterschiede aufwies, sollte die Konzentration des gelösten Proteins auch im Serum der Spender gemessen werden. Wie sich herausstellte, lag sCD163 in der Gruppe der Typ 2 Diabetiker und der übergewichtigen Kontrollen in höherer Konzentration vor als bei den gesunden, normalgewichtigen Spendern. Innerhalb der Gruppe der Diabetiker und der übergewichtigen Probanden konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten festgestellt werden. Eine Erhöhung der Konzentration an gelöstem CD163 im Zusammenhang mit Übergewicht bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen konnte auch von Axelsson et al. nachgewiesen werden. Die Forschungsgruppe konnte eine signifikante Steigerung des löslichen Proteins im Serum oben genannter Patienten feststellen, wobei sie den Terminus des „urämisch-metabolischen Syndroms“ bei Patienten mit Übergewicht und gleichzeitig bestehender Urämie prägte, nachdem sie deutliche Übereinstimmungen zwischen der Stoffwechselsituation bei terminaler Niereninsuffizienz und dem Metabolischen Syndrom bei Übergewicht aufzeigen konnten. Dadurch konnte einmal mehr die proinflammatorische Eigenschaft des löslichen CD163 verdeutlicht werden. [103]



#### **4.4.8 Korrelation von sCD163 und anthropometrischen Daten der Spender**

Eine Analyse der Konzentrationen an gelöstem CD163 im Serum vor dem Hintergrund der anthropometrischen Daten der jeweiligen Blutspender zeigte eine positive Korrelation zwischen sCD163 und dem Alter der Spender. Ein diesbezüglicher Zusammenhang konnte schon von Weiss et al. bestätigt werden, welche das Protein als antiinflammatorischen Biomarker zur Beurteilung der Prognose bei Patienten mit Sepsis beschrieben. [104] Demnach ist die Konzentration an sCD163 altersabhängig und nimmt mit steigendem Alter der Probanden zu. Eine Korrelation des Proteins mit anderen anthropometrischen Daten der Spender, wie etwa dem BMI oder der WHR, konnte nicht nachgewiesen werden. Auch ein Zusammenhang mit metabolischen Größen der Spender, wie etwa der Glukose- oder der Lipidkonzentration, konnte nicht aufgezeigt werden.

#### **4.4.9 Einfluss einer koronaren Herzerkrankung auf die Konzentration an gelöstem CD163**

Im Rahmen eines akuten oder chronischen, entzündlichen Geschehens kommt es zu einer vermehrten Bildung von sCD163, wodurch dieses Protein als ein möglicher potenter Prädiktor für die Prognose der jeweiligen Erkrankung gilt und als diagnostischer Parameter verwendet werden kann. Auch im Rahmen von atherosklerotischen Gefäßerkrankungen ist die Konzentration an sCD163 signifikant erhöht, wie Aristoteli et al. zeigen konnten. Die Höhe des sCD163-Spiegels ist dabei stark abhängig von der Schwere der atherosklerotischen Veränderungen und nimmt mit zunehmendem Ausmaß der Erkrankung zu. [105] Ein derartiger Zusammenhang konnte auch in unserem Kollektiv nachgewiesen werden. Innerhalb der Gruppe der Typ 2 Diabetiker war bei etwa der Hälfte der Teilnehmer zusätzlich eine koronare Herzerkrankung diagnostiziert worden. Vergleicht man die Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und einer KHK mit den Diabetikern ohne einer Gefäßerkrankung, so lässt sich ein eindrucklicher Anstieg der Konzentration an sCD163 in der Gruppe von Patienten mit KHK feststellen. Die lösliche Form des monozyten- bzw. makrophagenspezifischen Proteins könnte somit als eine diagnostische Kenngröße im Plasma von Patienten mit atherosklerotischer Gefäßerkrankung Verwendung finden.

## 5 Zusammenfassung

Es ist eines der größten Paradoxa unserer Zeit: Während tausende Menschen verhungern, sterben andere an den Folgen von Übergewicht und den damit assoziierten Folgeerkrankungen des Metabolischen Syndroms. Das sogenannte „Wohlstandssyndrom“ ist ein immer ernster zu nehmendes gesundheitliches Problem der industrialisierten Welt und stellt das Gesundheitssystem vor eine große Herausforderung. Es ist nicht nur wichtig, die Folgeerkrankungen von Übergewicht pharmazeutisch behandeln zu können, sondern durch geeignete Präventionsmaßnahmen und Aufklärungsarbeit bereits die Entstehung von Übergewicht zu verhindern.

Das Risiko, ein Metabolisches Syndrom zu entwickeln, ist demnach stark erhöht bei Menschen mit Übergewicht, wobei insbesondere eine exzessive Vermehrung von viszeralem Fett eine Schlüsselrolle in der Pathogenese einzunehmen scheint. Das Fettgewebe als endokrines Organ produziert im übergewichtigen Organismus eine Vielzahl an proinflammatorischen Adipokinen und Zytokinen, wie etwa IL 6. Die dadurch verursachte chronische systemische Inflammation trägt maßgeblich zur Entstehung von Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2, atherosklerotischen Gefäßerkrankungen und anderen Folgeerscheinungen des Übergewichts bei.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Adiponektin, einem Hormon, das ausschließlich von Adipozyten gebildet wird, auf den Hämoglobin-Scavenger-receptor CD163 zu erforschen. Die Konzentration des Adipokins, welches antiinflammatorische, antidiabetische und antiatherogene Eigenschaften aufweist, ist bei Übergewicht und Diabetes mellitus vermindert. Auch die Expression von CD163 ist durch die veränderten Stoffwechselbedingungen des Metabolischen Syndroms verändert. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine mögliche Beeinflussung von CD163 durch Adiponektin in vitro, aber auch dessen Expression in Monozyten bei Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zu normalgewichtigen, gesunden Kontrollen zu untersuchen.

Wie die in vitro Ergebnisse zunächst zeigten, führt Adiponektin zu einer signifikanten Reduktion der CD163-Proteinexpression in Monozyten und Makrophagen. Neben dem zellulären CD163-Protein wird auch die Konzentration des Antigens auf der Zelloberfläche supprimiert. Adiponektin scheint aber keinen Effekt auf die gelöste

Form von CD163 im Sinne einer Abspaltung des Proteins von der Zelloberfläche zur Folge zu haben.

Während die p38 MAP-Kinase nicht an der Adiponektin-vermittelten CD163-Reduktion beteiligt ist, konnte die Rolle der AMPK nicht definitiv geklärt werden. Da Metformin und AICAR, welche beide als Agonisten der AMPK fungieren, eine Suppression der CD163-Konzentration in Monozyten bewirken, ist ein AMPK-vermittelter Weg jedoch wahrscheinlich.

Die Konzentration an freien Fettsäuren ist bei Übergewicht signifikant erhöht und trägt maßgeblich zur Entwicklung des Metabolischen Syndroms bei. Palmitinsäure und Ölsäure vermindern zelluläres CD163, wobei die durch Ölsäure bewirkte Reduktion von CD163 durch eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Adiponektin noch zusätzlich verstärkt werden kann. Eine Cholesterindepletion mit Hilfe der Substanzen Lovastatin und Cyclodextrin hingegen zeigte keine Auswirkungen auf die CD163-Expression.

Um die CD163-Verhältnisse auch vor dem Hintergrund veränderter Stoffwechselbedingungen im Rahmen des Metabolischen Syndroms näher beleuchten zu können, wurden drei Kollektive erstellt, welche sich aus Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen und normalgewichtigen Spendern zusammensetzten. Die Konzentration an zellulärem CD163 ist bei übergewichtigen Spendern und Patienten mit Typ 2 Diabetes ähnlich hoch, im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen jedoch signifikant verstärkt. Die Menge an löslichem CD163 im Überstand der Zellen hingegen wies keine relevanten Unterschiede innerhalb der drei Spenderkollektive auf. Weder zelluläres noch lösliches CD163 korrelierten mit der systemischen Konzentration an Adiponektin, was die Vermutung impliziert, dass eine Reihe weiterer, bisher unbekannter Faktoren an der CD163-Regulation bei Übergewicht und Typ 2 Diabetes beteiligt sind. Das proinflammatorische IL 6, ein starker Induktor von CD163 in vitro, beeinflusst eventuell auch in vivo die Konzentration an löslichem CD163. So korrelierte sCD163 im Überstand der Zellen positiv mit systemischen, jedoch nicht mit monozytärem IL 6. Vergleicht man allerdings die Konzentration an gelöstem CD163 im Serum der jeweiligen Kohorten, so ließ sich ähnlich wie für die membrangebundene Form eine signifikante Erhöhung der sCD163-Menge bei diabetischen und übergewichtigen Spendern im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen feststellen. sCD163 liegt folglich bei Übergewicht in erhöhter Konzentration vor, während es bei Typ 2 Diabetes zu keiner weiteren

---

Steigerung der Plasmakonzentration des Proteins kommt. Zwar fehlten Hinweise auf eine mögliche Korrelation von sCD163 im Serum zu anthropometrischen Daten der jeweiligen Spender, jedoch zeigten sich interessanterweise signifikant erhöhte Werte an sCD163 im Serum von Typ 2 Diabetikern, welche zusätzlich eine koronare Herzerkrankung aufwiesen im Vergleich zu Diabetikern ohne atherosklerotische Gefäßveränderungen. Dadurch konnte die Rolle von sCD163 als wichtiger Plasmamarker entzündlicher, kardiovaskulärer Erkrankungen bestätigt werden.

Die vorliegende Arbeit hat CD163 als weiteres, Adiponektin-reguliertes Protein identifiziert und liefert somit die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Rolle von CD163 in metabolischen Erkrankungen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Toplak, *Das Metabolische Syndrom - Beginn des tödlichen Quartetts?*. Journal für Kardiologie, 2005. **12**: p. 6 - 7.
2. Day, C., *Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology*. Diab Vasc Dis Res, 2007. **4**(1): p. 32-8.
3. Moller, D.E. and K.D. Kaufman, *Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective*. Annu Rev Med, 2005. **56**: p. 45-62.
4. Fantuzzi, G. and T. Mazzone, *Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(5): p. 996-1003.
5. Herold G., ed. *Herold - Innere Medizin*. 2008: Köln.
6. Europäische Ministerkonferenz der WHO zur Bekämpfung der Adipositas (2006), *Die Herausforderung Adipositas und Strategien zu ihrer Bekämpfung in der Europäischen Region der WHO*.
7. Robert Koch - Institut Berlin (2004), *Telefonischer Gesundheitssurvey des Robert - Koch - Instituts zu chronischen Krankheiten und ihren Bedingungen - Deskriptiver Erfahrungsbericht*.
8. Berg, A.H. and P.E. Scherer, *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 939-49.
9. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
10. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
11. Harman-Boehm, I., et al., *Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2240-7.
12. Tesch, G.H., *Role of macrophages in complications of type 2 diabetes*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(10): p. 1016-9.
13. Cipolletta, C., et al., *Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(9): p. 2779-86.
14. Kern, P.A., et al., *Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1779-85.
15. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26746-9.

16. Trujillo, M.E. and P.E. Scherer, *Adiponectin-journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome*. J Intern Med, 2005. **257**(2): p. 167-75.
17. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 79-83.
18. Weyer, C., et al., *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 1930-5.
19. Oh, D.K., T. Ciaraldi, and R.R. Henry, *Adiponectin in health and disease*. Diabetes Obes Metab, 2007. **9**(3): p. 282-9.
20. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 439-51.
21. Capeau, J., *The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow*. J Hepatol, 2007. **47**(5): p. 736-8.
22. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10697-703.
23. Buechler, C., et al., *Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 97-103.
24. Droste, A., C. Sorg, and P. Hogger, *Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(1): p. 110-3.
25. Yang, W.S., et al., *Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(8): p. 3815-9.
26. Cnop, M., et al., *Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex*. Diabetologia, 2003. **46**(4): p. 459-69.
27. Combs, T.P., et al., *Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 268-76.
28. Abbasi, F., et al., *Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin*. Diabetes, 2004. **53**(3): p. 585-90.
29. Kubota, N., et al., *Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 25863-6.

30. Arita, Y., et al., *Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell*. Circulation, 2002. **105**(24): p. 2893-8.
31. Ouchi, N., et al., *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin*. Circulation, 1999. **100**(25): p. 2473-6.
32. Matsuda, M., et al., *Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37487-91.
33. Yokota, T., et al., *Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1723-32.
34. Kazumi, T., et al., *Young men with high-normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than those with optimal blood pressure*. Diabetes Care, 2002. **25**(6): p. 971-6.
35. Hulver, M.W., et al., *Ethnic differences in adiponectin levels*. Metabolism, 2004. **53**(1): p. 1-3.
36. Wulster-Radcliffe, M.C., et al., *Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(3): p. 924-9.
37. Furukawa, K., et al., *Adiponectin down-regulates acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 in cultured human monocyte-derived macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(3): p. 831-6.
38. Tsao, T.S., et al., *Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50810-7.
39. Tomas, E., et al., *Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16309-13.
40. Neumeier, M., et al., *Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 803-8.
41. Hogger, P., et al., *Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163)*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1883-90.
42. Zwaldo, G., et al., *A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process*. Exp Cell Biol, 1987. **55**(6): p. 295-304.
43. Ritter, M., et al., *The scavenger receptor CD163: regulation, promoter structure and genomic organization*. Pathobiology, 1999. **67**(5-6): p. 257-61.

44. Graversen, J.H., M. Madsen, and S.K. Moestrup, *CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(4): p. 309-14.
45. Sarrias, M.R., et al., *The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system*. Crit Rev Immunol, 2004. **24**(1): p. 1-37.
46. Law, S.K., et al., *A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2320-5.
47. Moller, H.J., et al., *Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma*. Blood, 2002. **99**(1): p. 378-80.
48. Klinker R., P.H.C., Silbernagl S., ed. *Physiologie*. Vol. 5. 2005, Thieme - Verlag: p. 282 - 296.
49. Löffler G., ed. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Vol. 6. 2004, Springer - Verlag: p. 533 - 549.
50. Schaer, C.A., et al., *CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(1): p. 106-10.
51. Kristiansen, M., et al., *Identification of the haemoglobin scavenger receptor*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 198-201.
52. Schaer, D.J., A.I. Alayash, and P.W. Buehler, *Gating the radical hemoglobin to macrophages: the anti-inflammatory role of CD163, a scavenger receptor*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(7): p. 991-9.
53. Schaer, D.J., et al., *Hemophagocytic macrophages constitute a major compartment of heme oxygenase expression in sepsis*. Eur J Haematol, 2006. **77**(5): p. 432-6.
54. Abraham, N.G. and G. Drummond, *CD163-Mediated hemoglobin-heme uptake activates macrophage HO-1, providing an antiinflammatory function*. Circ Res, 2006. **99**(9): p. 911-4.
55. Schaer, C.A., et al., *Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin*. Circ Res, 2006. **99**(9): p. 943-50.
56. Fabrick, B.O., et al., *The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria*. Blood, 2009. **113**(4): p. 887-92.
57. Weaver, L.K., et al., *Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(3): p. 663-71.
58. Dinarello, C.A., *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock*. Chest, 1997. **112**(6 Suppl): p. 321S-329S.



- 
59. Sulahian, T.H., et al., *Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155*. Cytokine, 2000. **12**(9): p. 1312-21.
  60. Hintz, K.A., et al., *Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(4): p. 711-7.
  61. Gaini, S., et al., *New immunological serum markers in bacteraemia: anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis*. Clin Exp Immunol, 2008. **151**(3): p. 423-31.
  62. Gaini, S., et al., *Soluble haemoglobin scavenger receptor (sCD163) in patients with suspected community-acquired infections*. APMIS, 2006. **114**(2): p. 103-11.
  63. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis*. N Engl J Med, 2003. **348**(2): p. 138-50.
  64. Walter, R.B., et al., *Expression of the hemoglobin scavenger receptor (CD163/HbSR) as immunophenotypic marker of monocytic lineage in acute myeloid leukemia*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3755-6.
  65. Moller, H.J., et al., *Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163*. Crit Care Med, 2006. **34**(10): p. 2561-6.
  66. Hiraoka, A., et al., *Soluble CD163 in patients with liver diseases: very high levels of soluble CD163 in patients with fulminant hepatic failure*. J Gastroenterol, 2005. **40**(1): p. 52-6.
  67. Matsushita, N., et al., *Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3*. Clin Exp Immunol, 2002. **130**(1): p. 156-61.
  68. Baeten, D., et al., *Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(5): p. 1611-23.
  69. Moller, H.J., et al., *Plasma level of the macrophage-derived soluble CD163 is increased and positively correlates with severity in Gaucher's disease*. Eur J Haematol, 2004. **72**(2): p. 135-9.
  70. Schaer, D.J., et al., *Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome*. Eur J Haematol, 2005. **74**(1): p. 6-10.
  71. Hogger, P. and C. Sorg, *Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(4): p. 841-3.

- 
72. Frings, W., J. Dreier, and C. Sorg, *Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect.* FEBS Lett, 2002. **526**(1-3): p. 93-6.
  73. Levy, A.P., et al., *Downregulation of the hemoglobin scavenger receptor in individuals with diabetes and the Hp 2-2 genotype: implications for the response to intraplaque hemorrhage and plaque vulnerability.* Circ Res, 2007. **101**(1): p. 106-10.
  74. Ormerod M.G., ed. *Flow - Cytometrie*. Vol. 2. 1999, Springer - Verlag: New York: p. 109.
  75. Tang, C.H., et al., *Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway.* J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5483-92.
  76. Weigert, J., et al., *Reduced response to adiponectin and lower abundance of adiponectin receptor proteins in type 2 diabetic monocytes.* FEBS Lett, 2008. **582**(12): p. 1777-82.
  77. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.* Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
  78. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade.* FASEB J, 1995. **9**(9): p. 726-35.
  79. Hardie, D.G., *AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism.* Int J Obes (Lond), 2008. **32 Suppl 4**: p. 7-12.
  80. Foretz, M., et al., *[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases].* Med Sci (Paris), 2006. **22**(4): p. 381-8.
  81. Miranda, N., et al., *[AMPK as a cellular energy sensor and its function in the organism].* Rev Invest Clin, 2007. **59**(6): p. 458-69.
  82. Viollet, B., et al., *Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders.* Diabetes Metab, 2007. **33**(6): p. 395-402.
  83. Sanz, P., *AMP-activated protein kinase: structure and regulation.* Curr Protein Pept Sci, 2008. **9**(5): p. 478-92.
  84. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling.* Circ Res, 2007. **100**(3): p. 328-41.
  85. Corton, J.M., et al., *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?* Eur J Biochem, 1995. **229**(2): p. 558-65.
  86. Bray, G.A., et al., *Overweight and obesity: the pathogenesis of cardiometabolic risk.* Clin Cornerstone, 2009. **9**(4): p. 30-40; discussion 41-2.

- 
87. Boden, G., *Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2003. **111**(3): p. 121-4.
  88. Boden, G., *Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(3): p. 241-8.
  89. Boden, G., *Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance*. Endocr Pract, 2001. **7**(1): p. 44-51.
  90. Boden, G., *Obesity and free fatty acids*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2008. **37**(3): p. 635-46, viii-ix.
  91. Bobbert, T., et al., *Acute hyperinsulinaemia and hyperlipidaemia modify circulating adiponectin and its oligomers*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(4): p. 507-11.
  92. Schaffler, A., J. Scholmerich, and B. Salzberger, *Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs*. Trends Immunol, 2007. **28**(9): p. 393-9.
  93. Waki, H. and P. Tontonoz, *Endocrine functions of adipose tissue*. Annu Rev Pathol, 2007. **2**: p. 31-56.
  94. Bulcao, C., et al., *The new adipose tissue and adipocytokines*. Curr Diabetes Rev, 2006. **2**(1): p. 19-28.
  95. Despres, J.P. and I. Lemieux, *Abdominal obesity and metabolic syndrome*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 881-7.
  96. Despres, J.P., *Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat*. Crit Pathw Cardiol, 2007. **6**(2): p. 51-9.
  97. Maury, E. and S.M. Brichard, *Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **314**(1): p. 1-16.
  98. Shimada, K., T. Miyazaki, and H. Daida, *Adiponectin and atherosclerotic disease*. Clin Chim Acta, 2004. **344**(1-2): p. 1-12.
  99. Zoccali, C., et al., *Adiponectin, metabolic risk factor, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(1): p. 134-41.
  100. Zhang, M.H., et al., *Adiponectin and inducible ischemia in patients with stable coronary heart disease: data from the Heart and Soul study*. Atherosclerosis, 2009. **205**(1): p. 233-8.
  101. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3463-8.

- 
102. Schober, F., et al., *Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **361**(4): p. 968-73.
  103. Axelsson, J., et al., *Changes in fat mass correlate with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD*. Am J Kidney Dis, 2006. **48**(6): p. 916-25.
  104. Weiss, M. and E.M. Schneider, *Soluble CD163: An age-dependent, anti-inflammatory biomarker predicting outcome in sepsis*. Crit Care Med, 2006. **34**(10): p. 2682-3.
  105. Aristoteli, L.P., et al., *The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2006. **184**(2): p. 342-7.

## 7 Anhang

### Eigene Publikationen

**Sporrer, D.**, Weber, M., Wanninger, J., Weigert, J., Neumeier, M., Stögbauer, F., Bala, M., Kopp, A., Schäffler, A., Buechler, C.,

Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity.

Eur J Clin Invest, 2009. **39**(8): p. 671-9.

Weber, M., **Sporrer, D.**, Weigert, J., Stögbauer, F., Wanninger, J., Neumeier, M., Schäffler, A., Schölmerich, J., Buechler, C.,

Adiponectin downregulates galectin-3 whose cellular form is elevated whereas its soluble form is reduced in type 2 diabetic monocytes.

FEBS Lett, 2009. **538**(22): p. 3718-24.

Stögbauer, F., Weigert, J., Neumeier, M., Wanninger, J., **Sporrer, D.**, Weber, M., Schäffler, A., Enrich, C., Wood, P., Grewal, T., Aslanidis, C., Buechler, C.,

Annexin A6 is highly abundant in monocytes of obese and type 2 diabetic individuals and is downregulated by adiponectin in vitro.

Exp Mol Med, 2009. **41**(7): p. 501-7.

Weigert, J., Neumeier, M., Wanninger, J., Schober, F., **Sporrer, D.**, Weber, M., Schramm, A., Wurm, S., Stögbauer, F., Filarsky, M., Schäffler, A., Aslanidis, C., Schölmerich, J., Buechler, C.,

Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes.

Cytokine, 2009. **45**(2): p. 86-91.

---

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name: Daniela Sporrer  
Geburtsdatum: 20.03.1985  
Geburtsort: Straubing  
Familienstand: ledig  
Adresse: Wiesenweg 1, 94356 Kirchroth  
Email: Daniela.Sporrer@tele2.de

### Ausbildung

#### *Hochschulstudium*

10/2004-11/2010 Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg  
11/2010 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 1,5  
10/2006 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 2,0

#### *Schulbildung*

09/1995-07/2004 Anton-Bruckner-Gymnasium, Abitur Note 1,3

### Praktische Erfahrung

#### *Praktisches Jahr*

06/2010-07/2010 Universität Regensburg, Innere Med I,  
Prof. Dr. Schölmerich  
04/2010-05/2010 Universität Regensburg, Innere Med I,  
Prof. Dr. Andreesen  
12/2009-04/2010 Universität Regensburg, Dermatologie,  
Prof. Dr. Dr. Landthaler  
09/2009-12/2009 Kantonsspital Liestal, Chirurgie, Prof. Dr. Maurer

#### *Famulaturen*

03/2009 University of Dubai, General Surgery, Prof. Dr. Hartung  
09/2008 Universität Regensburg, Innere Med I,  
Prof. Dr. Andreesen  
03/2007 Allgemeinarztpraxis Dres. Becker, Kirchroth  
Allgemeinarztpraxis Dr. Gluth-Sigl, Steinach  
02/2007 Klinikum St. Elisabeth, Straubing, Innere Medizin,  
Prof. Dr. Weigert

---

**Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Christa Büchler für die exzellente Betreuung der Doktorarbeit und die umfassende Hilfestellung bei allen Problemen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von PD Dr. Christa Büchler für ihre Hilfe im Labor bedanken.

Ein großer Dank richtet sich auch an alle Spender, die sich zum Abnehmen von Blut für die Monozytenisolierung zur Verfügung gestellt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Menschen, die mich mental unterstützt und mit ihren Gedanken immer bei mir waren.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ohne die weder das Bestreiten des Medizinstudiums noch das Entstehen dieser Dissertation möglich gewesen wäre. Nur durch ihre Hilfe war es möglich, die nötige Kraft und Ausdauer für diesen langen Weg der Ausbildung aufzubringen.

Mein größter Dank gebührt meinem Freund und Laborkameraden Markus für seine unglaubliche Hilfsbereitschaft und die wunderbare Zusammenarbeit.

---

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Kirchroth, den 01.02.2011

---

Daniela Sporrer